

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-208461

(43) 公開日 平成9年(1997)8月12日

(51) Int.Cl. <sup>4</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K	31/045		A 6 1 K	31/045
A 2 3 B	7/14	9282~4B	A 2 3 B	7/14
A 2 3 L	2/42		A 2 3 L	3/349
	3/349			3/3544
	3/3544			3/3562

審査請求 未請求 請求項の数13 O L (全 15 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平8-14801	(71) 出願人	000227009 日清製油株式会社 東京都中央区新川1丁目23番1号
(22) 出願日	平成8年(1996)1月30日	(72) 発明者	栗山 健一 神奈川県横浜市神奈川区中丸1-309
		(72) 発明者	松橋 淳 神奈川県横浜市磯子区森6-27-9-228
		(72) 発明者	松口 晴子 神奈川県横浜市旭区西川島町47-7-201
		(72) 発明者	辻 宏明 神奈川県横浜市磯子区森6-27-9-325
		(74) 代理人	弁理士 中村 稔 (外7名)

最終頁に続く

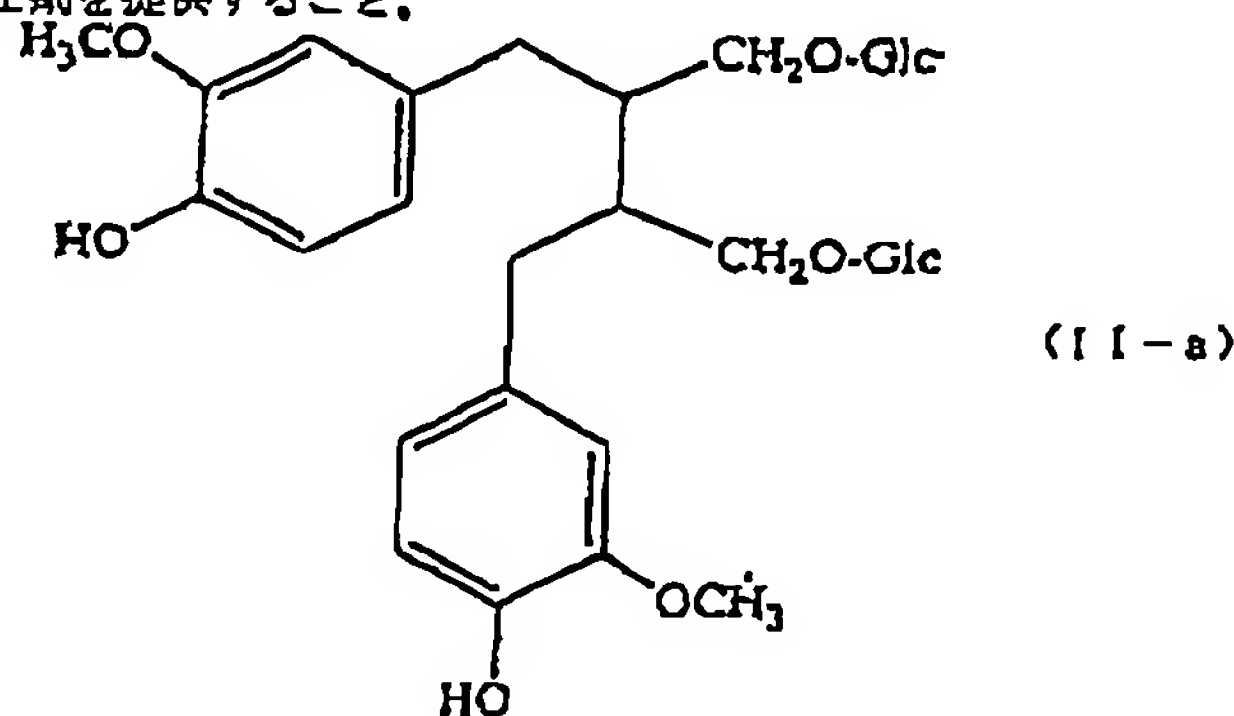
(54) 【発明の名称】 活性酸素種消去剤及び退色防止剤

(57) 【要約】

【課題】 スーパーオキサイドやヒドロキシラジカル等の活性酸素種を消去することができる効果が顕著である新規な活性酸素種消去剤及び退色防止効果の持続性に優れ、かつ安全性の高い退色防止剤を提供すること。

【解決手段】 下記の式で示されるリグナン化合物又はその類縁体を有効成分としてなる活性酸素種消去剤又は退色防止剤。

【化3】



(式中、Glc はグルコース残基、Gal はガラクトース残基を表す。)

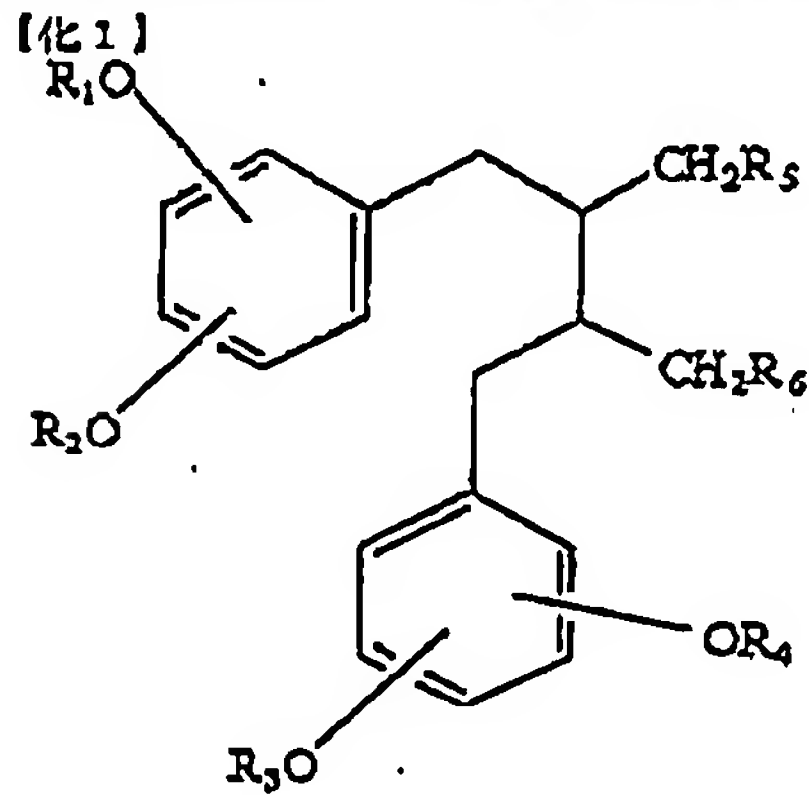
(2)

特開平9-208461

2

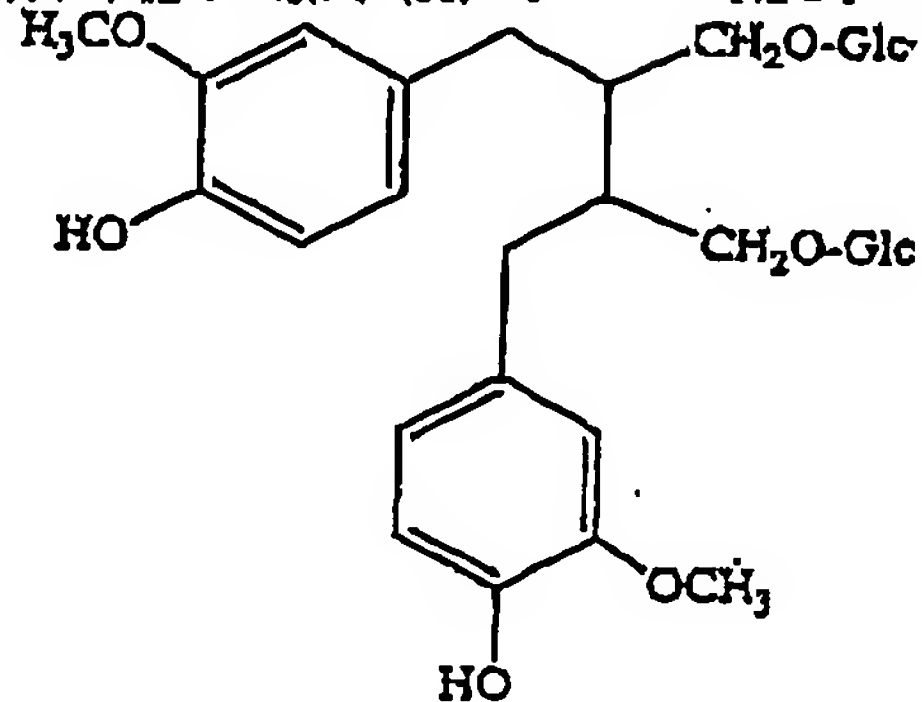
## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記的一般式(I)で示されるリグナン化合物を有効成分としてなる活性酸素種消去剤。

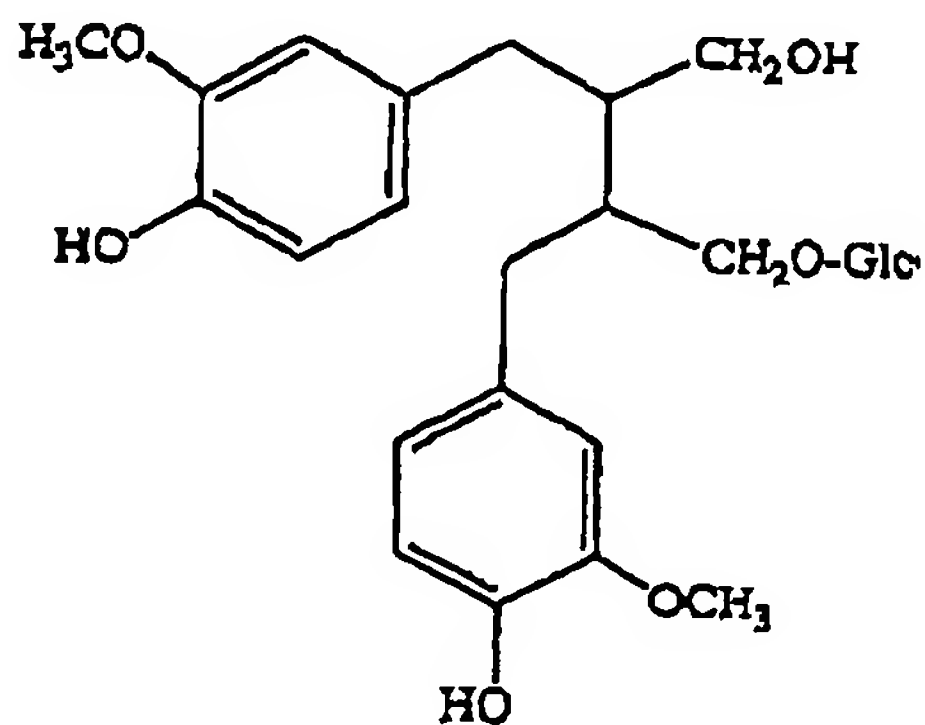


(式中、R<sub>1</sub>～R<sub>4</sub>はそれぞれ独立して水素原子又は炭素数1～3のアルキル基、R<sub>5</sub>とR<sub>6</sub>はそれぞれ独立してヒドロキシ基、あるいはグルコース、ガラクトースおよびフルクトースからなる群から選ばれる1種または2種以上の糖が1～3個グリコシド結合した前記糖鎖残基、あるいはR<sub>5</sub>とR<sub>6</sub>が一緒になって酸素原子を表す。)

【請求項2】 リグナン化合物が下記的一般式(II)で

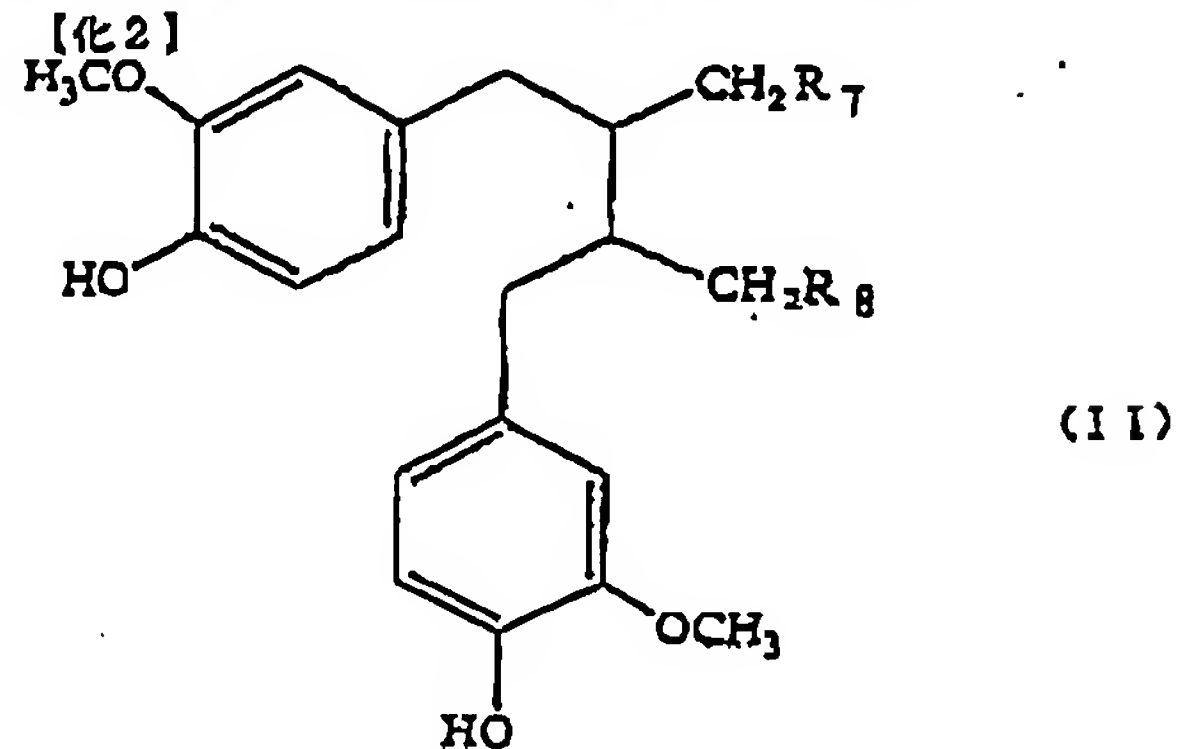


【化4】



【化5】

表される請求項1記載の活性酸素種消去剤。

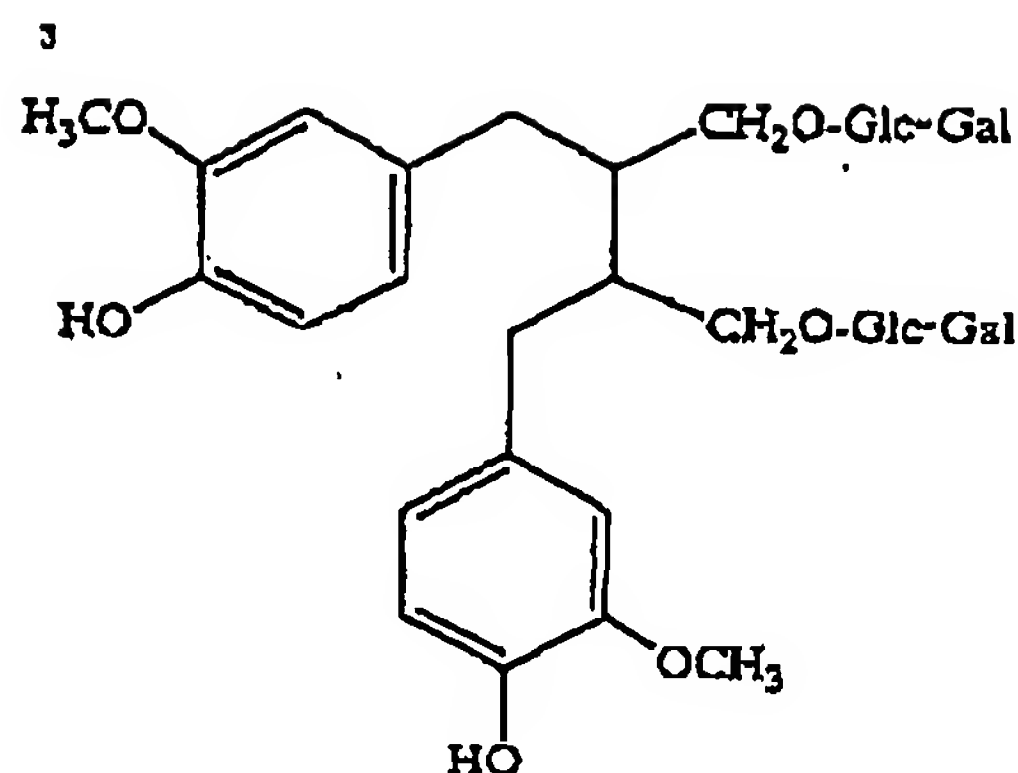


(式中、R<sub>7</sub>およびR<sub>8</sub>は同一もしくは異なり、それぞれ独立してヒドロキシ基、あるいはグルコース、ガラクトースおよびフルクトースからなる群から選ばれる1種類または2種以上の糖が1～3個グリコシド結合した前記糖鎖残基、あるいはR<sub>7</sub>とR<sub>8</sub>が一緒になって酸素原子を表す)

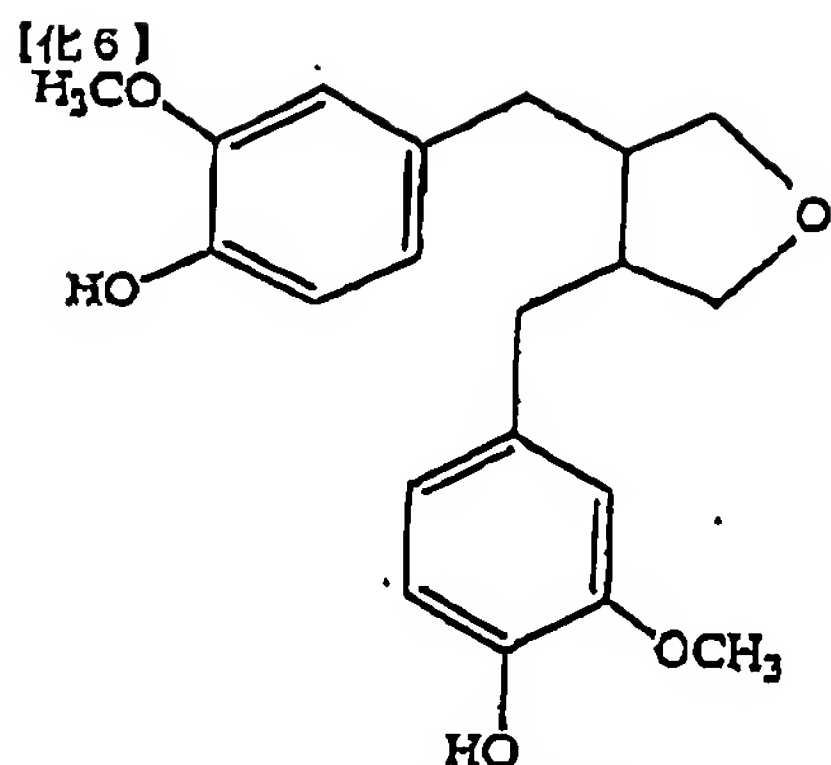
【請求項3】 リグナン化合物が下記の構造式(II-a)、(II-b)、(II-c)および(II-d)で表される化合物から選ばれる少なくとも1種である請求項1又は2に記載の活性酸素種消去剤。

(3)

特開平9-208461



(II-c)



(II-d)

(式中、Glcはグルコース残基、Galはガラクトース残基を表す。)

【請求項4】 リグナン化合物がアマ種子もしくはその焙煎物の粉碎物または脱脂粕を低級アルコールまたは含水低級アルコールで抽出して得られる成分である請求項1～3のいずれか1項に記載の活性酸素種消去剤。

【請求項5】 リグナン化合物がアマ種子もしくはその焙煎物の粉碎物または脱脂粕を低級アルコールまたは含水低級アルコールで抽出し、該抽出物を酸加水分解後、該加水分解物の非水溶性有機溶媒による抽出物を濃縮することによって得られる成分である請求項1～3のいずれか1項に記載の活性酸素種消去剤。

【請求項6】 活性酸素種がスーパーオキシドおよび/またはヒドロキシラジカルである請求項1～5のいずれか1項に記載の活性酸素種消去剤。

【請求項7】 請求項1記載の一般式(I)で示されるリグナン化合物を有効成分としてなる退色防止剤。

【請求項8】 請求項2記載の一般式(II)で示されるリグナン化合物を有効成分としてなる請求項7の退色防止剤。

【請求項9】 リグナン化合物が請求項3記載の構造式(II-a)、(II-b)、(II-c)および(II-d)で表される化合物から選ばれる少なくとも1種である請求項7又は8の退色防止剤。

【請求項10】 リグナン化合物がアマ種子もしくはその焙煎物の粉碎物または脱脂粕を低級アルコールまたは含水低級アルコールで抽出して得られる成分である請求

項7～9のいずれか1項に記載の退色防止剤。

【請求項11】 リグナン化合物がアマ種子もしくはその焙煎物の粉碎物または脱脂粕を低級アルコールまたは含水低級アルコールで抽出し、該抽出物を酸加水分解後、該加水分解物の非水溶性有機溶媒による抽出物を濃縮することによって得られる成分である請求項7～9のいずれか1項に記載の退色防止剤。

【請求項12】 リグナン化合物としてアマ種子もしくはその焙煎物の粉碎物または脱脂粕を用いるものである請求項7～9のいずれか1項に記載の退色防止剤。

【請求項13】 さらにL-アスコルビン酸又はその塩を含有する請求項7～12のいずれか1項に記載の退色防止剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、スーパーオキシドやヒドロキシラジカル等の活性酸素種を消去するのに有効な活性酸素種消去剤、及び魚介類、水産加工品、畜産加工品、野菜や果実等の退色（褐変）を防止するのに有効な退色防止剤に関するものである。

【従来の技術】生物は、酸素を利用することによって生存に必要なエネルギーを効率的に得ている。しかしながら、このようなエネルギー代謝のうち酸素が水に変換される過程で、中間体として活性酸素種が生じる。一般にこの活性酸素種としては、マクロファージの刺激等によって放出されるスーパーオキシド、放射線の被曝等によって生成されるヒドロキシラジカル等が知られている。これらの活性酸素種は過度の放射線や紫外線の照射、化学物質やタバコの摂取等の外的誘因と虚血再還流、炎症、ストレス、老化等の内的要因とが原因となって生成する。このようにして生体内で過剰に生成する活性酸素種は、一般に化学的反応性が高く、生体内で隣接する脂質や核酸、蛋白質等の成分と容易に反応し、さまざまな疾病に繋がる酸化障害をもたらす。

【0002】従って、スーパーオキシドやヒドロキシラジカルで代表される活性酸素種を効率的に消去する活性を有する活性酸素種消去物質は、生体内または食品や医薬品、農薬等に含まれる成分の酸化劣化の防御剤として有用であり、食品産業、特に水産加工品、健康食

(4)

特開平9-208461

5

品、栄養食品のほか、医薬品、農薬や化粧品等の分野において実利的な利用が期待されている。このため、さまざまな活性酸素種消去物質が、主に天然物由来の原料から抽出され、その応用が検討されている。例えばスーパーオキシドを消去する酵素蛋白質であるスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)は、ウシやラットからの調製が検討され、ヒドロキシラジカル消去活性を有するものとしてマンニトール、トリプトファン、ギ酸等があげられている(例えば、大柳壽彦著、「SODと活性酸素種調製剤—その薬理的作用と臨床応用」、第224～228頁、日本医学館、1989年)。

【0003】しかしながら、SODは酵素蛋白質であるため熱、pHなどに対する安定性が乏しく、さらには経口投与の場合、投与した酵素のほとんどは消化、排泄されてしまい、その実行力は極めて低かった。また、ヒドロキシラジカルを微量で効率的に消去できる実用的なヒドロキシラジカル消去剤は現在のところほとんど存在しない。従って、これら活性酸素種消去剤を工業的に多量に、かつ安定に入手することは困難なのが現状である。また、通常、SODはスーパーオキシドに対してのみ消去効果を有し、ヒドロキシラジカルに対しては全く効果がない。同様にマンニトールはヒドロキシラジカルに対して消去活性があるが、スーパーオキシドを消去することができない。このようにスーパーオキシドやヒドロキシラジカルで代謝される活性酸素種を消去する活性を有する有効成分の安定供給が望まれているにも関わらず、これまで工業的に実用化された例はほとんど無い。

【0004】一方、魚介類、水産加工品、畜産加工品、野菜および果実等の退色及び褐変は、消費者の目による嗜好性に反し、鮮度そのものとは無関係に商品価値を低下させている。例えば、牛肉等の肉類や鮭、鰯等赤身魚に含まれるミオグロビンが空気中で光線に曝されると極短時間にメト化し、ミオグロビン分子中の鉄原子が二価から三価になることにより、肉色は鮮紅色から茶褐色に変化する。鯛のように体表にアスタキサンチン色素をもつ赤魚は、空気、光線、脂肪酸化酵素等の働きで、冷凍保存中といえども退色し、牛肉同様に嗜好性は低下する。この現象は単にミオグロビン、アスタキサンチン等の色素の変化であり、肉の鮮度とは関係なく進行する。野菜や果実では、それ自身に含まれる酵素の働きによって退色あるいは褐変が起こる。例えば、緑黄色野菜に含まれるカロチノイド色素はリポキシダーゼやペルオキシダーゼの作用によって分解する。果実では、リンゴ、バナナ、アズキ等のように組織中にポリフェノールオキシダーゼ類をもつものは、果皮を剥いで放置すると直ちに褐変を起こす。褐変により嗜好性は著しく低下し商品価値は激減する。また、野菜中のカロチノイド類は、酵素の不活性化処理が施されても、光や熱等によって容易に分解されてしまう。

6

【0005】従来、水溶性の退色防止剤としては還元性物質であるL-アスコルビン酸ナトリウム、没食子酸、茶葉抽出物(カテキン類)が利用され、また発色剤としては亜硝酸ナトリウム等を使用することにより食品等の色合いを保持することが試みられてきたにすぎない。しかしながら、L-アスコルビン酸のような還元性物質を単独使用すると、それ自体が短時間に酸化されてしまい、このため退色防止効果はさして強力なものではなかった。カテキン類にはそれ自体に特有の苦味や渋味があり、実用面での使用量には制約があり、退色防止効果にも限界があった。また亜硝酸ナトリウムはその安全性について検討の余地がある。

【0006】ところで、食品原材料として常用される天然物の一つにアマ種子がある。アマ種子は古くから栽培されてきた植物であり、現在でも赤道直下や極寒地帯を除いた世界の広い地域で栽培され、油糧用としてのみならず、繊維用作物あるいは薬用植物として重要である。アマ種子は一部の東欧やロシア地方で食用として利用されているが、リノレン酸含量の多いアマニ油は乾燥性が高いという性質から、塗料や印刷インキ、リノリウム、油紙等の原料として、またアマニ油粕は乳牛、肉牛、めん羊の飼料用蛋白としても広く用いられている。すなわちアマ種子は、比較的安定に入手可能な、また人体にとって安全性の高い植物材料であるといえる。

【0007】近年、アマ種子に特徴的な物質としてフェノール基を2つ有するリグナン化合物の生理的作用が注目されている。ここでリグナン化合物とは、p-ヒドロキシベンゼンプロパン単位の酸化的縮合物質のうち、低分子量のものであると一般に定義されている。アマ種子はリグナン類であるSecoisolariciresinol (2,3-bis(3-methoxy-4-hydroxybenzyl)butane-1,4-diol、以下SILと略することがある)をアグリコンとし、これにグルコースなどの糖が複数結合したSecoisolariciresinol diglycoside(以下SDGと略することがある)や前記糖が単数結合したSecoisolariciresinol mono-glycoside(以下SMGと略することがある)を多く含有する。SDGやSMGはアマ種子またはその脱脂粕を摂食する哺乳類等の生体内に存在する腸内細菌等の作用によって化学構造が変換され、生理活性を有するEnterodiolやEnterolactoneとなる。これらの物質は乳癌や結腸癌に対する強い抗癌活性を有することが解かっている。アマ種子は、その他の食用植物に比べこのSDGやSMGを極めて多量に含有することが示されており、生理活性リグナン類の前駆体としてこれを利用することが効果的であることが報告されている(たとえばS.C.Gunnane and L.U. Thompson著、「Flaxseed in Human Nutrition」、第219～236頁、AOAC press、1995年)。

【0008】このように、これまでアマ種子に多く含まれるSDGやSMGはEnterodiolやEnterolactoneの前駆体としての有用性が主に検討されてきた。しかしなが



特開平9-208461

(5)

7

ら、このSDGやSMGやその糖鎖加水分解物であるSILあるいはその脱水物である3,4-bis(3-methoxy-4-hydroxybenzyl) tetrahydrofuran (以下MHB Tと略することがある) が及ぼす前記以外の生理的機能やその応用例に関しては、これまでほとんど知られていなかった。

【0009】

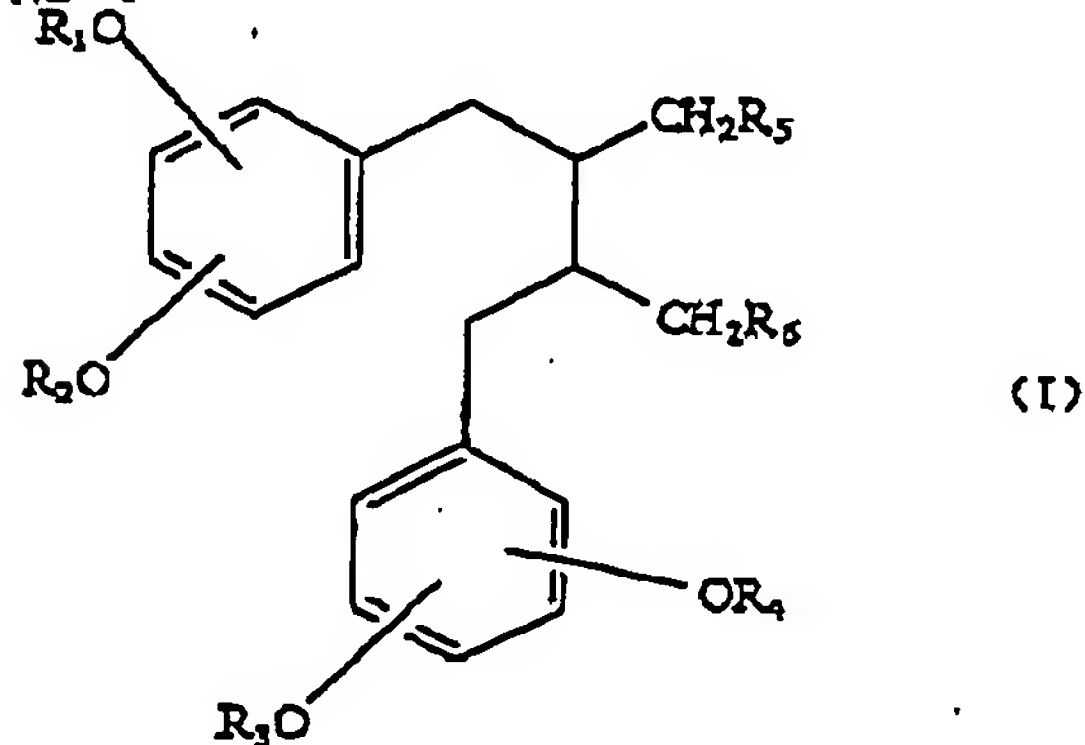
【発明が解決しようとする課題】本発明は、スーパーオキシドやヒドロキシラジカル等の活性酸素種を消去することができる効果が顕著である新規な活性酸素種消去剤を提供することを目的とする。本発明は、又、退色防止効果の持続性に優れ、かつ安全性の高い退色防止剤を提供することを目的とする。

【0010】

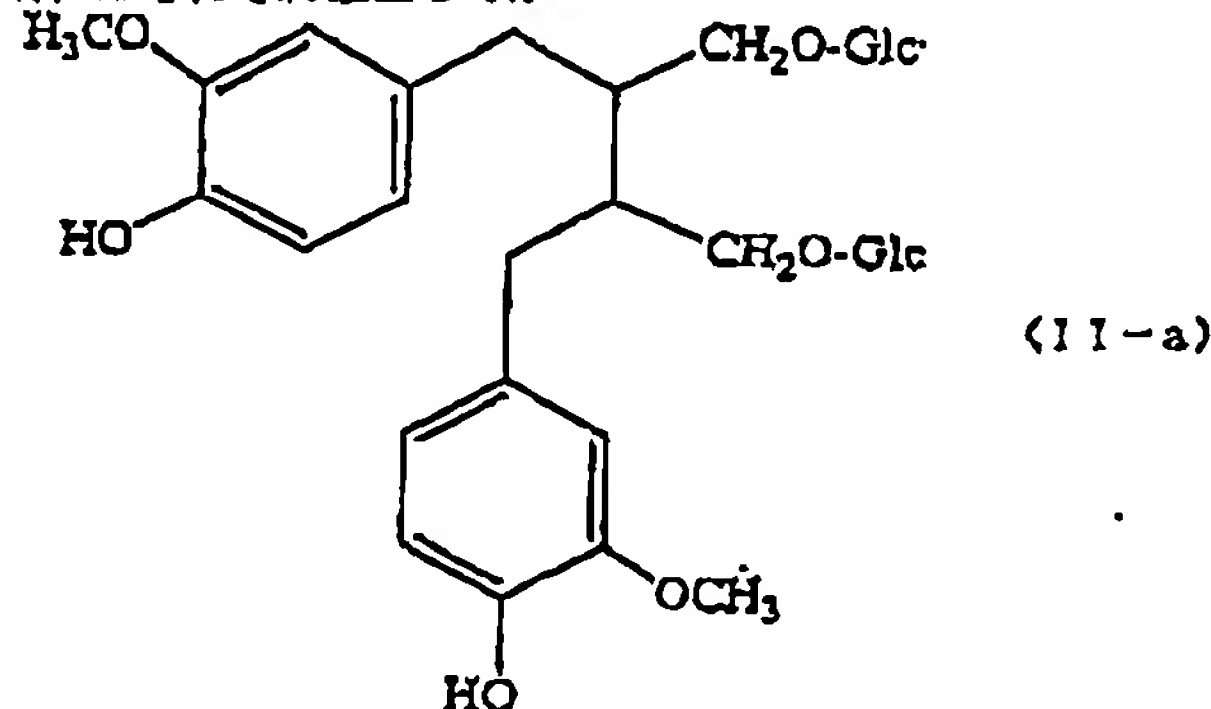
【課題を解決するための手段】本発明は、アマ種子に含まれる特定のリグナン化合物が、優れた活性酸素種消去作用を有し、又退色防止剤としてもすぐれており、該リグナン化合物によれば上記課題を効率的に解決できるとの知見に基づいてなされたのである。すなわち、本発明は、下記一般式(I)で示されるリグナン化合物を有効成分としてなる活性酸素種消去剤を提供する。

【0011】

【化7】



【0012】 (式中、R<sub>1</sub> ~ R<sub>4</sub> はそれぞれ独立して水



【0015】

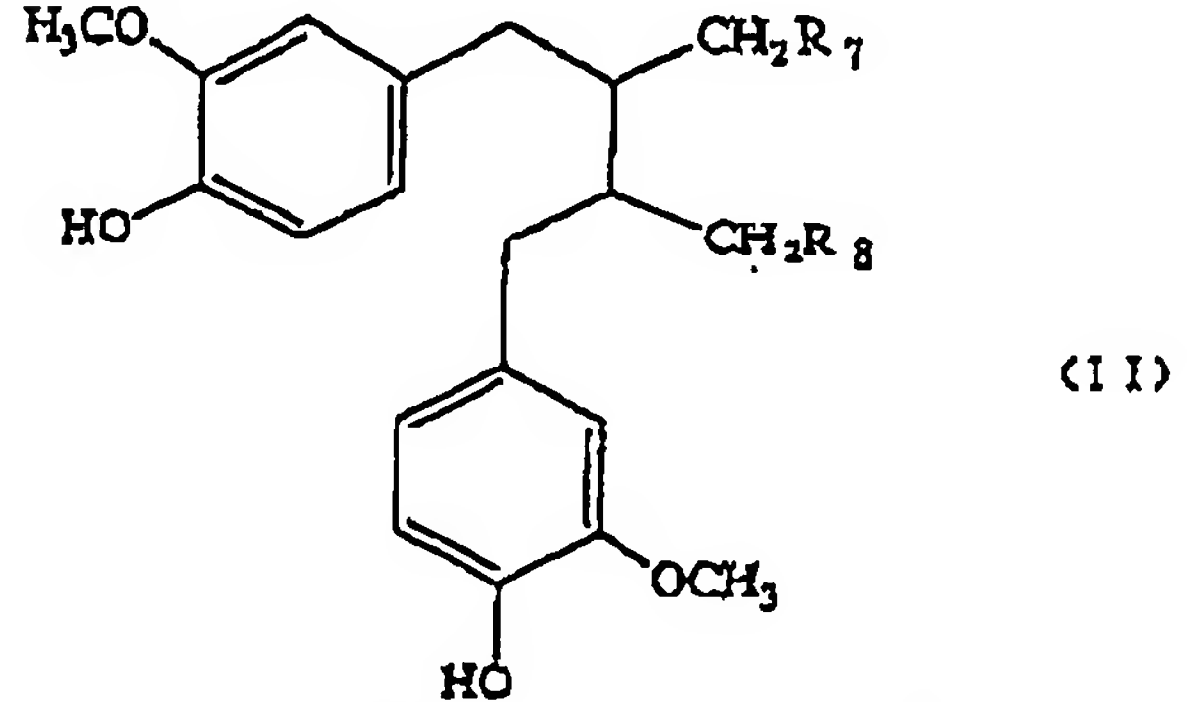
素原子又は炭素数1~3のアルキル基、R<sub>5</sub>とR<sub>6</sub>はそれぞれ独立してヒドロキシ基、あるいはグルコース、ガラクトースおよびフルクトースからなる群から選ばれる1種または2種以上の糖が1~3個グリコシド結合した前記糖鎖残基、あるいはR<sub>5</sub>とR<sub>6</sub>が一緒になって酸素原子を表す。)

本発明は、又、上記一般式(I)で示されるリグナン化合物を有効成分としてなる退色防止剤をも提供する。

【発明の実施の形態】本発明で用いる一般式(I)で示されるリグナン化合物のうち、下記一般式(II)で表される化合物が好ましく、さらに下記の構造式(II-a)、(II-b)、(II-c)および(II-d)で表される化合物から選ばれる化合物が好ましい。

【0013】

【化8】



【0014】 (式中、R<sub>7</sub> およびR<sub>8</sub> は同一もしくは異なり、それぞれ独立してヒドロキシ基、あるいはグルコース、ガラクトースおよびフルクトースからなる群から選ばれる1種類または2種以上の糖が1~3個グリコシド結合した前記糖鎖残基、あるいはR<sub>7</sub>とR<sub>8</sub>が一緒になって酸素原子を表す)

【0015】

【化9】

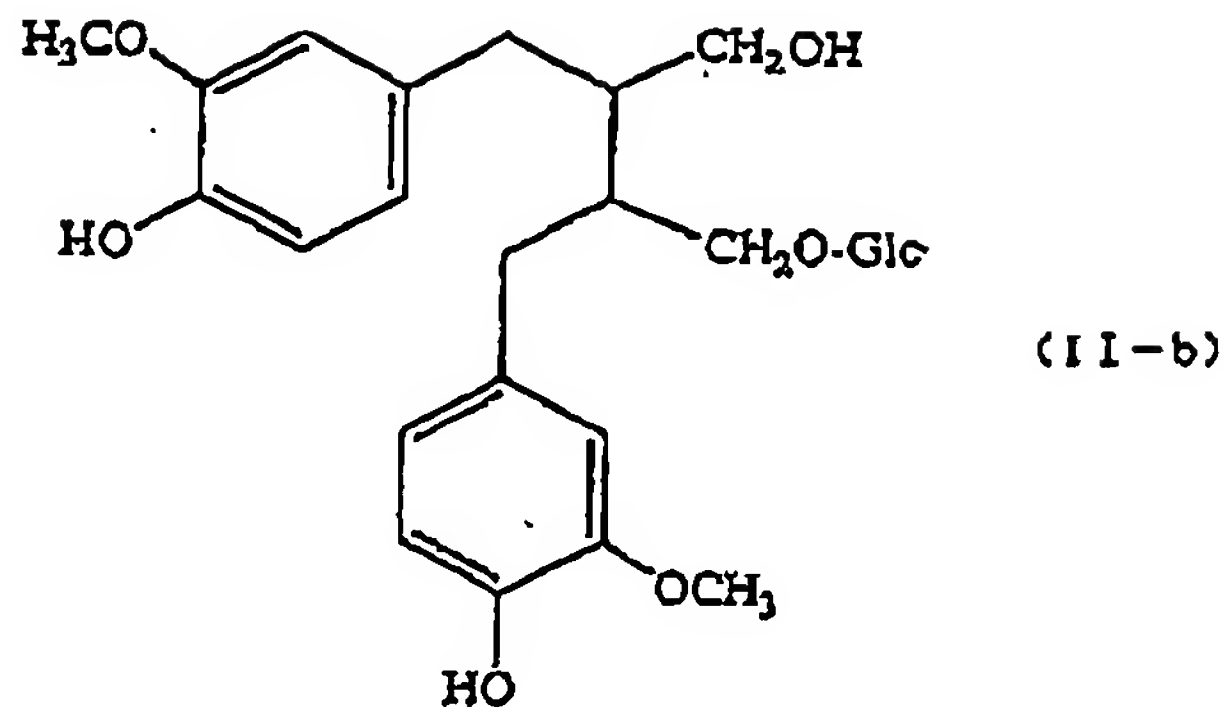
【化10】

(6)

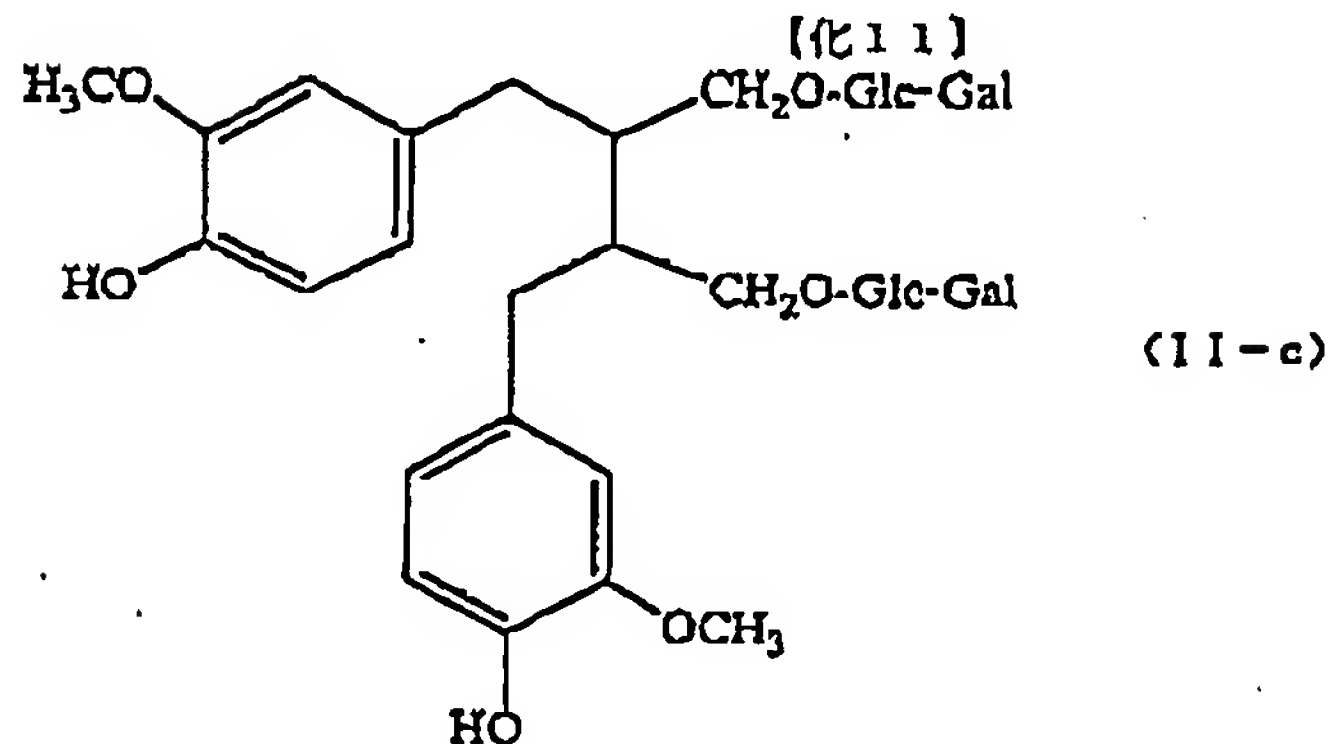
特開平9-208461

9

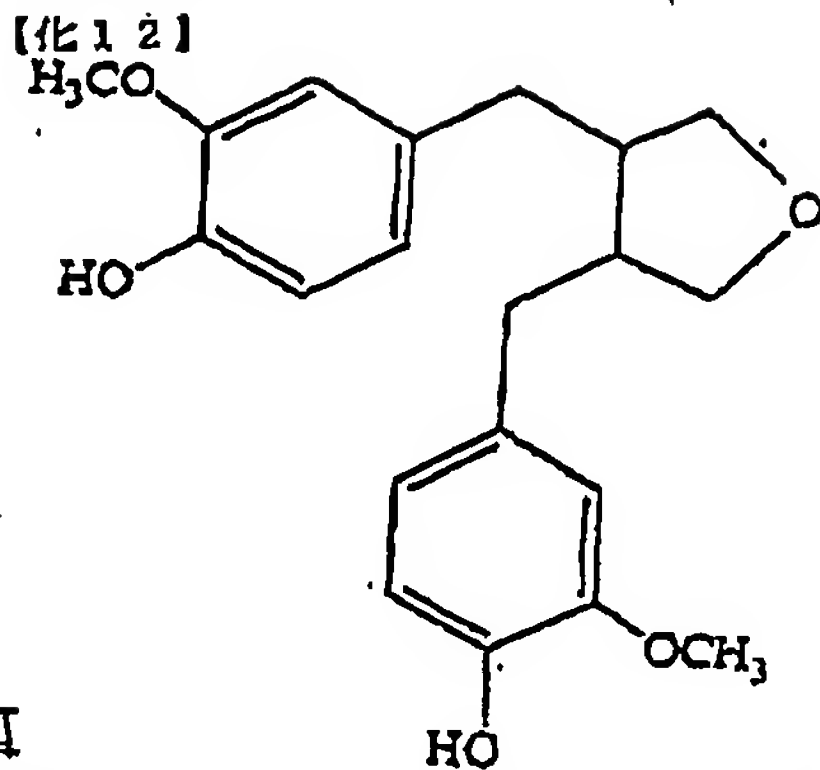
10



【0017】



【0018】



【0019】(式中、Glcはグルコース残基、Galはガラクトース残基を表す。)

本発明で用いる上記リグナン化合物であるSDGやSMGあるいはその糖鎖加水分解物であるSILあるいはその脱水物であるMHTは、化学的合成法により合成可能であるが、例えばアマ種子を原料として以下に述べる抽出方法により容易に調製することができる。具体的には、まずアマ種子をミキサーやブレンダー、ホモジナイザー等の粉碎機により粉碎する。ここで用いるアマ種子は、国内産、カナダ産等の産地、栽培用あるいは搾油用の品種を問わず使用でき、焙煎あるいは非焙煎の処理の有無に関係なく原料として使用できる。また搾油工程中に産出されるアマニ圧縮物や油粕を原料としてもよい。得られた粉碎物は、n-ヘキサン等の脂溶性有機溶媒で油

分を完全に抽出して除去した脱脂物としてもよい。次にSDGやSMGを抽出可能な低級アルコール又はその含水物を前記粉碎物あるいはその脱脂粕に対して1~10倍(v/wt)(ただし、v:容量、wt:重量を示す。以下同じ。)添加し、必要に応じて粉碎および抽出操作を繰り返し行い、デカンテーション、遠心分離、ろ過等の常法により固形物を除去した後、水分及びアルコール分を常圧又は減圧にて加熱又は非加熱で除き、アルコール抽出物を得る。該アルコール抽出物は本発明に関わるSDGやSMGを含む混合物である。

【0020】ここで用いる低級アルコールまたはその含水物としては、炭素数1~4の直鎖状もしくは側鎖状低級アルコール、例えばメタノール、エタノール、n-プロパノール、イソプロパノール、n-ブタノール等に必要に応じて水を混合し、アルコール濃度を30~100%(v/v)、好ましくは40~100%(v/v)、より好ましくは40~90%(v/v)、最も好ましくは50~80%(v/v)に調節したものがよい。30%(v/v)未満のアルコール濃度では、アマ種子に特有の粘質物が溶出してその後の操作が困難になるおそれがある。

【0021】なお、前記アルコール抽出物中の本発明に関わるリグナン化合物以外の脂溶性の不純物を除くために、以下のような溶媒抽出処理を行うこともできる。すなわち、アルコール抽出物に対して2~10倍(v/wt)の非水溶性有機溶媒、例えばクロロホルムやn-ヘキサンと水を加えて抽出し、遠心分離などにより二相に分離する。有機溶媒相を除き、水相を濃縮乾固させる。このと

(7)

特開平9-208461

11

12

き目的のSDGやSMG等のリグナン化合物は水相側に濃縮される。これを減圧乾燥して濃縮すれば、本発明に関わるSDGやSMGを多量に含む抽出画分（粗リグナン配糖体濃縮物）を得ることができる。かくして得られる粗リグナン配糖体濃縮物は、いずれも前記構造式（I）で示されるものの混合物であり、その主成分は前記構造式（II-a）や（II-b）で示されるSDGやSMGである。

【0022】なお前記したアルコール抽出物および粗リグナン配糖体濃縮物は、必要に応じてシリカゲル、オクタデシルシリカ（ODS）等の吸着剤を使用して、成分を分画、精製することもできる。すなわち、例えばODSを充填したカラムを作成し、これを水で平衡化した後、前記アルコール抽出物又は粗リグナン配糖体濃縮物を負荷率0.1～5%（w/v）で供し、含水アルコール溶媒（アルコールとしてメタノール、エタノール、n-プロパノール、イソプロパノール、n-ブタノール等）を用い、アルコール濃度を順次増加させる段階溶出法もしくは連続的溶出法により、所定の画分を溶出させる。なおここに得られる溶出画分は、必要に応じてさらに前記吸着剤を用いる高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、分取液体クロマトグラフィー等にして各成分をより一層高純度に精製することもできる。本発明では、かくしてSDGやSMG等の水溶性のリグナン化合物が得られ、該リグナン化合物として前記アルコール抽出物、粗リグナン配糖体濃縮物あるいは高純度精製物のいずれかを使用でき、あるいはこれらを混合して使用することができる。

【0023】次にアマ種子より得た前記アルコール抽出物又は粗リグナン配糖体濃縮物から、SILおよびMHB Tを調製する方法について述べる。前記アルコール抽出物又は粗リグナン配糖体濃縮物中にはSDGやSMGが多量に含まれているため、これを酵素または酸性物質を用いて加水分解することによりSDGやSMGから前記構造式（II-c）や（II-d）で示されるSILまたはMHB Tを容易に得ることができる。ただし、MHB Tは酸加水分解反応でSILから二次的に生成する脱水物であり、酵素加水分解反応では得られない成分である。前記アルコール抽出物又は粗リグナン配糖体濃縮物を水または適当な緩衝液に分散させ、糖鎖加水分解酵素であるβ-グルコシダーゼやセルラーゼ、α-グルコシダーゼ、β-ガラクトシダーゼ、α-ガラクトシダーゼ、アミラーゼ、グルクロニダーゼ等のグリコシダーゼ類のうち1種又は複数種を加え、あるいはこれら酵素剤を活性炭やセライト等の適当な担体に固定化し、連続使用並びに回収再使用を可能としたものに供し、10～60℃にて前記酵素と1～48時間接触せしめ、前記酵素の作用によりSDGやSMGの糖鎖を切断するか、前記アルコール抽出物又は粗リグナン配糖体濃縮物に塩酸、硫酸、リン酸、有機酸などの酸の存在下、50～200℃にて30分

～5時間加温すればよい。SDGやSMGから生成するSILあるいはMHB Tは、脂溶性のリグナン化合物であるため、酵素または酸加水分解反応液から、極性の低い有機溶剤で水に対して難溶性のn-ヘキサン、クロロホルム、酢酸エチル等を用いて効率的に抽出できる。抽出した有機溶媒相を濃縮することにより粗リグナン濃縮物を得ることができる。

【0024】なお必要に応じてシリカゲル、オクタデシルシリカ（ODS）等の吸着剤を使用して、SILまたはMHB Tを分画、精製することもできる。すなわち高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、分取液体クロマトグラフィー等にして各成分をより一層高純度に精製することもできる。本発明では、このようにして得た脂溶性の粗リグナン濃縮物、SIL またはMHB Tをそのまま又は混合して使用することができる。

【0025】なお、本発明の有効成分であるSDGやSMG、SILまたはMHB Tの生成方法および抽出法は、以上に述べられた方法に限られるものではない。さらにはこれらの有効成分を主成分とする抽出物の原料はアマ種子もしくはその焙煎物、それらの粉碎物および脱脂粕に限定されるわけではなく、上記本発明の一種であるSILを含む天然原料、たとえばカラマツの心材、パナ松の樹脂等を全て使用できる（例えば特開平7-25719号公報）。一方、ヒドロキシル基を含む化合物に糖鎖を付加し配糖体を合成する方法として、例えば糖転移酵素の作用を利用した生化学的方法や金属触媒を利用した化学的方法が汎用的に用いられている。SDGを原料として、糖種あるいは糖数を要望に応じて任意に変えたリグナン配糖体を合成することができる。

【0026】すなわち、例えば糖転移酵素の作用を利用した生化学的方法で行う場合、糖転移活性を有する酵素であるグリコシダーゼ類、例えばβ-グルコシダーゼ、α-グルコシダーゼ、β-ガラクトシダーゼ、α-ガラクトシダーゼ、サイクロデキストリン合成酵素、β-フラクトフラノシダーゼ、セルラーゼ、アミラーゼ等を単独にもしくは組み合わせて利用することができ、糖供与体はグルコース、ガラクトース等の単糖類、セロビオース、ショ糖等の2糖類、ラフィノース等のオリゴ糖類、あるいは多糖類等を利用することができる。ただし配糖体の糖鎖を構成する糖種を限定する場合は、それに応じ糖転移酵素および糖供与体を適宜に選択する必要がある。これらの糖転移酵素および糖供与体をSILを含む濃縮物または精製物に加え、緩衝液または水で溶解し10～60℃で加温または室温条件で1～100時間反応させる。反応液からのリグナン配糖体の抽出および精製は、上述の分配抽出法、カラム分画および分取HPLCを利用することができ、目的のリグナン配糖体を有する濃縮物および精製物を得ることができる。

【0027】本発明の活性酸素種消去剤及び退色防止剤は、上記リグナン化合物単独からなるものでもよく、又



(8)

特開平9-208461

13

上記リグナン化合物を有効成分とし、これらの有効成分と適当な希釈剤もしくは担体との組成物の形態であつてもよい。このような希釈剤もしくは担体の例としては、例えばアラビアガム、キサンタンガム、デキストリン、シクロデキストリン、デンプン、グルコース、シュクロース、ラクトース、キシロース、ガラクトオリゴ糖、キシロオリゴ糖等の固体希釈剤もしくは担体；更に、例えば水、エタノール、プロピレングリコール、グリセリン、乳化剤等のごとき液体希釈剤もしくは担体を1種または2種以上配合した組成物とすることができる。

【0028】乳化剤のうち親油性乳化剤として好適なものは、市販の各種グリセリン脂肪酸エステル、プロピレングリコール脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル、ショ糖脂肪酸エステル、ポリグリセリン脂肪酸エステル、ペンタエリスリトール脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンソルビット脂肪酸エステル、ポリオキシエチレングリコール脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンフェニルエーテル、ポリオキシエチレンヒマシ油、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油およびレシチン等が挙げられる。親水性乳化剤として好適なものとしては、市販の各種アニオン系、非イオン系、カチオン系、両性系の種々の乳化剤を使用することができる。

【0029】アニオン系乳化剤としては、例えば石鹸N-アシルアミノ酸塩、アルキルエーテルカルボン酸、アシル化ペプチド等のカルボン酸塩、アルキルスルホン酸塩、アルキルベンゼンスルホン酸塩、アルキルナフタレンスルホン酸、およびそのホルマリン縮合物、ジアルキルスルホコハク酸エステル塩、 $\alpha$ -オレフィンスルホン酸塩、N-アシルメチルタウリン等のスルホン酸塩、硫酸化油、アルキル硫酸塩、アルキルエーテル硫酸塩、アルキルアリルエーテル硫酸塩、アルキルアミド硫酸塩のような硫酸エステル塩、アルキルリン酸塩、アルキルエーテルリン酸塩、アルキルアリルエーテルリン酸塩のようなリン酸エステル塩等が挙げられる。

【0030】また非イオン系乳化剤としては、例えばポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレン2級アルコールエーテル、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル、アルキルフェノールホルマリン縮合物の酸化エチレン誘導体、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンブロックポリマー等のエーテル型界面活性剤、ポリオキシエチレングリセリン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンヒマシ油および硬化ヒマシ油、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンソルビトール脂肪酸エステルのようなエーテルエステル型界面活性剤、ポリオキシエチレングリコール脂肪酸エステル、脂肪酸モノグリセリド、ソルビタン脂肪酸エステル、ショ糖脂肪酸エステル、ポリグリセリン脂肪酸エステルのようなエステル型界面活性剤、脂肪酸アルカノールアミド、ポリオキシエチレン脂肪酸アミ

14

ド、ポリオキシエチレンアルキルアミン、アルキルアミンオキサイドのような含窒素型界面活性剤等が挙げられる。カチオン系乳化剤としては、例えばアルキルアミン塩、4級アンモニウム塩、ベンザルコニウム塩、ピリジニウム塩等が挙げられ、さらに両性系乳化剤としては、例えばカルボキシペタイン型、アミノカルボン酸塩、イミダゾリニウムペタイン、レシチン等が挙げられる。

【0031】本発明の活性酸素種消去剤は、上記形態で、又はさらに助剤や添加物と共に製剤化して経口、非経口の製品として、飲食品、水産加工品、化粧品、医薬部外品、医薬品、農薬等の分野で利用することができる。なお、添加量は対象とする製品の種類および形態によって一律には規定しがたいが、アルコール抽出物の場合には100ppm~100,000ppm、より好ましくは1,000ppm~100,000ppm、粗リグナン配糖体濃縮物および粗リグナン濃縮物の場合には10ppm~50,000ppm、より好ましくは100ppm~10,000ppm、また高純度精製物の場合には0.1ppm~10,000ppm、より好ましくは1ppm~1,000ppmとするのがよい。一方、本発明の退色防止剤は、上記有効成分のほかに所望により従来既知の退色防止剤又はシネルギストを配合することができる。上記式で表されるリグナン化合物、アマ種子から得られる搾油粕（油粕、脱脂物）あるいはアルコール抽出物に配合もしくは併用できる退色防止剤を例示すると、アスコルビン酸、アスコルビン酸ナトリウム、エリソルビン酸、エリソルビン酸ナトリウム、没食子酸、没食子酸プロピルエステル、アスコルビン酸パルミテート、アスコルビン酸ステアレート等を挙げることができ、その中から1種または2種以上の化合物を使用することができる。これらのうち、L-アスコルビン酸又はその塩を用いるのが好ましい。アマ種子から得られる搾油粕あるいはアルコール抽出物と併用できるシネルギストとして、ポリリン酸ナトリウム、ポリリン酸カリウム、メクリン酸ナトリウム、メタリン酸カリウム、クエン酸、クエン酸3ナトリウム、クエン酸3カリウム、リンゴ酸、リンゴ酸2ナトリウム、リンゴ酸2カリウム、酒石酸、酒石酸2ナトリウム、酒石酸2カリウム、フマル酸、フマル酸2ナトリウム、フマル酸2カリウム、アジピン酸、アジピン酸2ナトリウム、アジピン酸2カリウム、クエン酸モノグリセリド、リンゴ酸モノグリセリド、酒石酸モノグリセリド、フマル酸モノグリセリド、アジピン酸モノグリセリド、トコフェロール等が挙げられ、その中から、1種または2種以上を使用することができる。該組成物中の有効成分の濃度は厳密には制限されないが、通常約0.1~約40重量%の範囲内が好適である。更に該退色防止剤は任意の剤形に調製することができ、例えば、粉末状、顆粒状、液状、乳液状、ペースト状その他任意の剤形とすることができる。

【0032】本発明の退色防止剤を用いて退色を防止し得る対象物としては、例えば魚介類の場合、鮪、鮭、鱈



(9)

特開平9-208461

15

16

等の赤身の魚の魚肉、鯛類等の赤魚の体表、エビ、カニ等甲殻類の体表、タコ、イカ類等の軟体動物、ホタテ、アワビ、アカガイ等の貝類等、水産加工品の場合、魚肉ソーセージ、鰯鮓、竹輪、魚の塩漬、魚の干し物等、畜産加工品の場合、畜肉、ハム、ソーセージ等、野菜類は、ニンジン、ピーマン、レタス、キャベツ等、果実の場合は、リンゴ、ブドウ、オレンジ等各種果汁、バナナの黒変防止等を挙げることができる。前記の魚介類、水産加工品、畜産加工品、野菜および果実等に対する本発明の退色防止剤の添加量は、アルコール抽出物を単独使用した場合、直接投与で10ppm～100,000ppm、望ましくは50ppm～50,000ppm、浸漬などの間接投与で100ppm～200,000ppm溶液、望ましくは500ppm～100,000ppm溶液として使用する。また前記の粗リグナン配糖体濃縮物または粗リグナン濃縮物を単独使用の場合には、直接投与で1ppm～100,000ppm、望ましくは5ppm～50,000ppm、間接投与では10ppm～200,000ppm、望ましくは50ppm～100,000ppmとするのがよい。高純度精製物を同様に用いる場合には、直接投与で0.1ppm～100,000ppm、望ましくは1ppm～50,000ppm、間接投与では1ppm～200,000ppm、望ましくは10ppm～100,000ppmとするのがよい。本発明の退色防止剤には前記のアマ種子またはその焙煎物から得られるアルコール抽出物、その濃縮物および精製物、その加水分解物等のほかにアマ種子またはその焙煎物の搾油粕をそのまま添加してもよい。搾油粕を単独使用した場合は、アルコール抽出物の添加量の5～10倍が望ましく、上限は100,000ppmである。数百ppm程度の添加量で持続性の高い退色防止効果が得られるが、カテキン等のような苦味や渋味もないし、また食品素材として安全性も高いので添加量について特に制約を設けるものではない。前記添加量未満では退色防止効果が弱く、搾油粕の場合は100,000ppmを超えて添加すると粘性が生じてしまう。アルコール抽出物の場合は200,000ppmを超えて添加しても粘性が生じることはないが、該添加量に見合うさらなる効果は望めない。

#### 【0033】

【発明の効果】本発明によれば、スーパーオキシドやヒドロキシラジカルを同時に効果的に消去し得る活性を有する活性酸素種消去剤が提供される。又、本発明の退色防止剤は、現在使用されているアスコルビン酸などと比較して、はるかに強力な退色防止効果をもち、効力の持続安定性の面でも優れている。また、無味無臭で添加した食材の風味にも影響を与えない点で優れている。次に実施例により本発明を説明する。

#### 【実施例】

##### 実施例1

カナダ産アマ種子1000gをブレンダーにて粉碎後、3倍量(v/wt)のn-ヘキサンを加え、60℃で3時間還流させ抽出を行った。ろ過後得られた脱脂粕のうち50gを風乾し、これに3倍量(v/wt)のアルコール濃度：

80重量%（以下、%と略称する）の含水メタノールを加え、60℃で5時間還流し抽出した。放冷後全量をろ過し、ろ液を濃縮乾固してメタノール抽出物70gを得た。

#### 【0034】実施例2

実施例1で得られたメタノール抽出物30gを、ODSを担体とする分配クロマトグラフィーに繰り返し供した。すなわちYMC-GEL（（株）ワイ・エム・シー製）ODS-A60gを直径3cm、長さ50cmのガラス性カラムに充填して、水を流して平衡化した。これにメタノール抽出物をカラムの上部に負荷した。水から順次メタノール濃度を増加させる段階溶出法によって、目的物質の溶出を行った。30～70%（v/v）メタノール含水溶液で溶出する画分を集め、減圧濃縮したところ約4.5gの粗リグナン配糖体濃縮物が得られた。これを分取HPLCに繰り返し供して、SDGやSMGが単一となるまで精製を行った。その結果、前記構造式(II-a)で示されるSDG精製物350mgおよび(II-b)で示されるSMG精製物30mgの各精製物が得られた。分取HPLCは以下の条件で行った。HPLC装置は、ポンプ（CCPM、東ソー（株）製）にカラム（綜研科学（株）製、Soken Pak）ODS-W5μ、10x250mm）、紫外吸収検出器（東ソー（株）製、UV-8000）を接続し、溶出は、水：メタノールが50：50から40分後に10：90となる直線グラジエントを用い、流速を5mL/min、検出波長は280nmとした。尚、糖種及び糖数の分析は次のようにして行った（以下、同じ）。

#### 【0035】糖種の分析

SDGまたはSMGの精製物各1mgとβ-グルコシダーゼ（アーモンド由来、Sigma社製）0.1mgを50mM酢酸緩衝液（pH5.0）1mLに溶解し、50℃で24時間加温した。酢酸エチル1mLを加え振とう抽出後酢酸エチル相を除き、水相をHPLC用前処理フィルクー（孔径0.2μm、マイシヨリディスクW-13-2、東ソー社製）でろ過し、ろ液にアセトン5mLを加えて減圧下で濃縮乾固した。トリメチルシリル化剤であるTMS-PZ（東京化成工業社製）0.2mLを加え常温で30min放置した後、その1μLを以下の条件のガスクロマトグラフで分析した。分析条件は以下の通り。ガスクロマトグラフ装置、HEWLETT PACKARD 5890；カラム、DB-1701（15m×0.25mm, Film Thickness, 1.0μm, J&W SCIENTIFIC社製）；注入法、スプリット法（スプリット比1/50）；カラム温度、180℃；キャリアガス、He。標準として市販のグルコース、ガラクトースおよびフルクトースを使用し、それぞれの配糖体を構成する糖種を分析した。

#### 【0036】糖数の分析

SDGまたはSMGの精製物各1mgを水1mLに溶解し、そのうちの一部を分子篩クロマトグラフィーに供し、それぞれの分子量を見積った。分子篩クロマトグラフィー

の分析条件は以下の通り。カラム；TSK-gel G25  
00PWXL（東ソー社製）×2、溶離液；50mM-NaNO<sub>3</sub>  
水溶液、流速；0.8mL/min、検出器；屈折率計および紫  
外検出器。標準として、セロビオース、ラフィノース、  
スタキオース、セロペンタオース、セロヘキサオースな  
どのオリゴ糖を同様に分析し、分子量とリテンションタ  
イムの標準曲線を作成した後、これを用いてリグナン配  
糖体の分子量を見積った。

### 【0037】 实施例3

実施例 1 で得られたメタノール抽出物 20 g に 1 N の塩酸溶液 1 L を加え、100 °C で 1 時間還流させた。放冷後 1 L の酢酸エチルを加え分配抽出を行った。酢酸エチル相を濃縮乾固して酢酸エチル抽出物 450 mg を得た。これを分取 HPLC に繰り返し供して、S I L や M H B T が単一になるまで精製を行った。その結果、前記構造式 (II-c) で示される S I L 精製物 120 mg、(II-d) で示される M H B T 精製物 50 mg が得られた。分取 HPLC は実施例 2 と同様の方法で行った。

### 【0038】实施例4

実施例 1 で得られたメタノール抽出物 20 g および市販酵素剤である  $\beta$ -グルコシダーゼ（アーモンド由来、シグマ（社）製）、セルラーゼ（トリコデルマビリデ由来、ペーリンガー・マンハイム山之内（株）製、）各 1 g に 50 mM 酢酸緩衝液（pH 5.0）1 L を加え、50℃で 24 時間振とうした。放冷後 1 L の酢酸エチルを加え分配抽出を行った。酢酸エチル相を濃縮乾固して酢酸エチル抽出物 500 mg を得た。これを分取 HPLC に繰り返し供して、分画成分が単一になるまで精製を行った。その結果、前記構造式 (II-c) で示される S 1 L 精製物 200 mg が得られた。

**【0039】 实施例5**

精製したSDG 100mgおよびガラクトース100mgを含む酢酸緩衝液(pH5.0) 1mLに市販の $\alpha$ -ガラクトシナーゼ(生化学工業社製) 1単位を加え、50℃で24時間反応させた。反応液を10分間煮沸して酵素を失活させた後、反応液を、実施例2で示したODSを担体とする分配クロマトグラフィーに繰り返し供した。基質であるSDG以外に、SDGよりも極性の高い画分に少なくとも新たな3種の芳外吸収成分A、B及びCが溶出した。これらの各成分をさらに実施例2で示した条件で分取HPLCに供して精製した結果、各精製物A(約2mg)、B(約5mg)及びC(約10mg)を得た。この

A、B及びCの精製物を、酸加水分解によるアグリコンと糖の分析、 $\beta$ -グルコシダーゼと $\alpha$ -ガラクトシダーゼによる酵素加水分解による糖の分析、分子篩クロマトグラフィーによる分子量推定に供した。なお、分子篩クロマトグラフィーの分析条件は以下のように行った。カラム：TSK-gel G 2500 PWXL（東ソー社製） $\times$  2、溶離液：50mM- $\text{NaNO}_3$ 水溶液、流速：0.8 mL/min、検出器：屈折率計および紫外検出器。標準として、ラフィノース、スタキオースなどのオリゴ糖を同様に分析し、分子量とリテンションタイムの標準曲線を作成して見積った。各分析の結果、成分Aは（A-1）アグリコンとしてSIL骨格を有すること、（A-2）酸加水分解によりグルコースとガラクトースが等モル生成すること、（A-3） $\beta$ -グルコシダーゼで加水分解すると単糖であるグルコースと、3糖の2成分が等モル生成すること、（A-4） $\alpha$ -ガラクトシダーゼで加水分解するとガラクトースのみが生成すること、（A-5）4配糖体であることが明らかになった。

【0040】以上のことから成分Aは、構造式III-aで示される新規なリグナン配糖体であることが示唆された。同様に成分Bは（B-1）アグリコンとしてSIL骨格を有すること、（B-2）酸加水分解によりグルコースとガラクトースが等モル生成すること、（B-3）β-グルコシダーゼで加水分解するとグルコースとガラクトースからなる2糖のみが生成すること、（B-4）α-ガラクトシダーゼで加水分解するとガラクトースのみが生成すること、（B-5）4配糖体である。以上のことから成分Bは、構造式III-bで示される新規なリグナン配糖体であることが示唆された。成分Cは（C-1）アグリコンとしてSIL骨格を有すること、（C-2）酸加水分解によりグルコースとガラクトースが2：1のモル比で生成すること、（C-3）β-グルコシダーゼで加水分解すると単糖であるグルコースと、グルコースとガラクトースからなる2糖の2成分のみが生成すること、（C-4）α-ガラクトシダーゼで加水分解するとガラクトースのみが生成すること、（C-5）3配糖体である。以上のことから成分Cは、構造式III-cで示される新規なリグナン配糖体であることが示唆された。尚、式中、Glcはグルコース残基、Galはガラクトース残基を表す。

【0041】

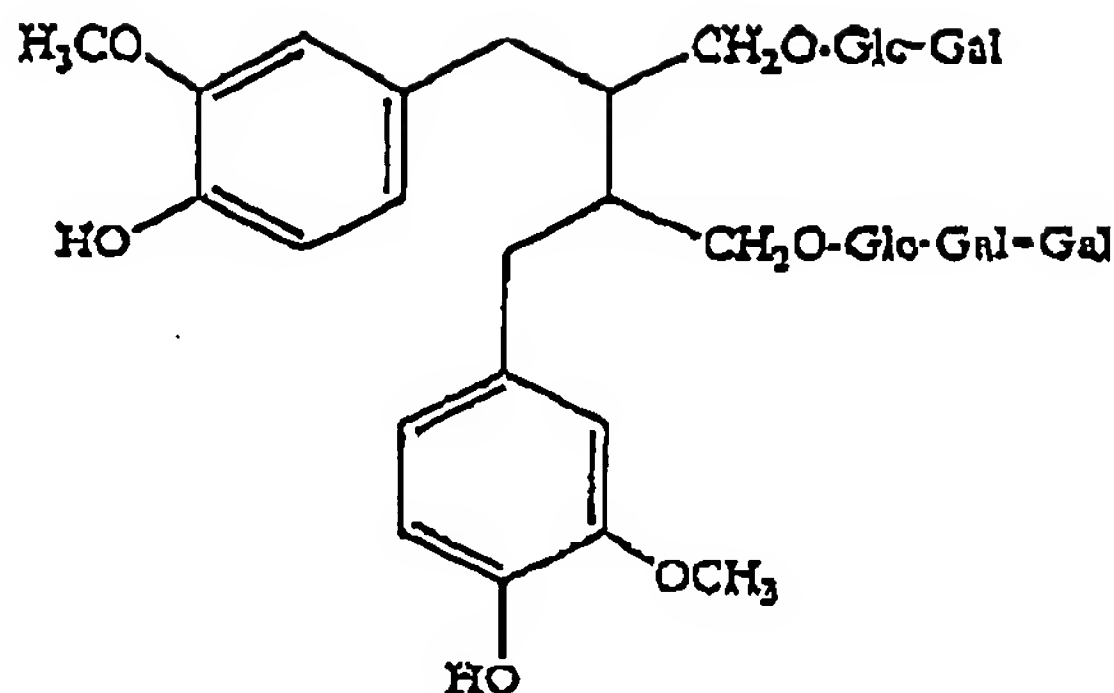
【化 1 3】

(11)

特開平 9-208461

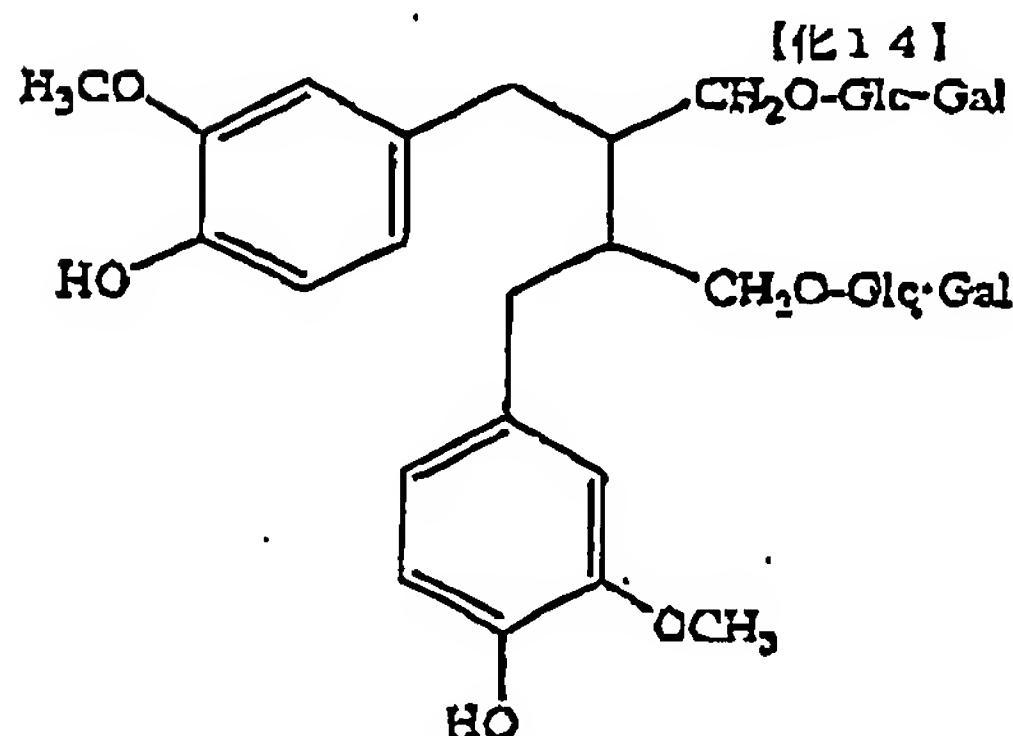
18

20



(III-D)

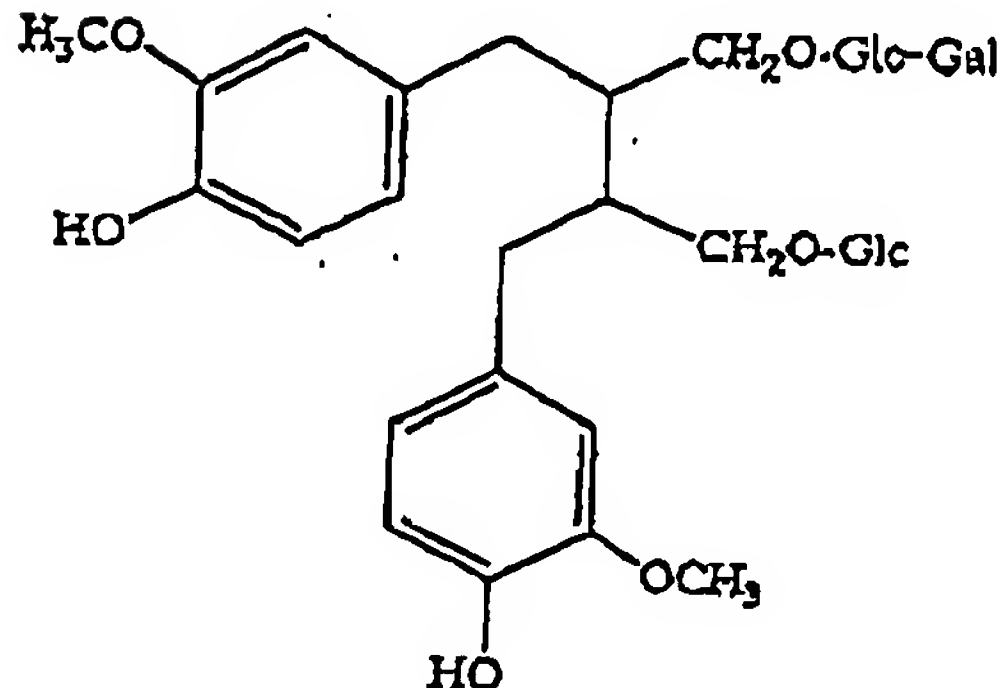
【0042】



(111-b)

[ 0 0 4 3 ]

【化 1 5】



(III-c) :

### 【0044】实施例6

スーパーオキシド消去活性は、金田尚志、植田仲夫編集、「過酸化脂質実験法」、第138～154頁、医歯薬出版（株）、1993年発行に記載の方法に従い以下のように測定した。炭酸水素ナトリウム緩衝液（pH 10.2）

1. 2 mLに1 mg/mL EDTA 溶液50  $\mu$  L、1. 5 mg/mL ウシ血清アルブミン (BSA) 溶液50  $\mu$  L、0. 6 mg/mL ニトロブルーテトラソリウム (NBT) 溶液50  $\mu$  L、0. 5 mg/mL キサンチン溶液50  $\mu$  Lを加えた溶液で、所定量の実施例1に記載のアルコール抽出物、実施例2に記載の粗リグナン配糖体濃縮物、SDGやSMG、実施例3に記載のSIL、MHBT、実施例5に記載の成分A~Cの各精製物あるいは市販の抗酸化剤である $\alpha$ -ブチルヒドロキシアニソール (BHA) を溶解・混和した

後、25℃にて10分間放置した。これに8 mg/mL キサンチンオキシダーゼ（バターミルク由来、和光純薬工業

(株) 型) 溶液  $50\mu\text{L}$  を加え攪拌し、 $25^{\circ}\text{C}$  にて 20 分間放置した。  $1\text{mg/mL}$  塩化銅水溶液  $50\mu\text{L}$  を加えて酵素反応

を停止させた後、560nm の吸光度値 (A) を測定した。

試料溶液の代わりに同量の緩衝液のみを加えたものを対照溶液とし、塩化銅水溶液と試料溶液の添加順序を逆に

したものを試料ブランクとして同様に吸光度を測定し、

それぞれの値を  $B$ ,  $b$  とした。以下の式からスーパーオ

$$\text{率}(\%) = \{1 - (A - b) / B\} \times 100, \text{スーパー}$$

オキシドの消去率が50%となる消去活性を1単位(1

unit) とした。表 1 に示したように、活性値が高いほど

消去作用が強いことを示しているが、添加したアルコ＝

(12)

特開平9-208461

21

22

ル抽出物および精製物はすべて顕著なスーパーオキシ  
ド消去作用を示しており、例えば1  $\mu$ mol のSIL精製  
物の添加でBHA添加のときの2倍以上の高い消去活性  
を有していた。従って、本発明に関わるSDGやSM  
G、SILまたはMHBTを主成分とする抽出物、濃縮

物および精製物は、いずれも強いスーパーオキシド消  
去活性を有することが認められた。

【0045】

【表1】 表-1

サンプル	スーパーオキシド消去活性(units)
アルコール抽出物	4.5
粗リグナン配糖体濃縮物	15.0
成分A	31.5
成分B	31.0
成分C	30.6
SDG 精製物	31.0
SMG 精製物	33.5
SIL 精製物	32.9
MHBT精製物	35.8
BHA	12.8

注) アルコール抽出物または粗リグナン配糖体濃縮物の場合は反応系中  
に1mg、各精製物およびBHAは1  $\mu$ mol 存在したときの活性値を示す。

## 【0046】実施例7

ヒドロキシラジカル消去活性は以下のように測定した。  
本実施例で用いた反応系はフェントン反応にてヒドロキ  
シラジカルを発生させ、そのヒドロキシラジカルと脂肪  
酸との反応により生じるマロンジアルデヒド(MDA)  
をチオバルビツール酸と反応させたときに生成するチオ  
バルビツール酸-MDAアダクトを測定する方法に基づ  
いている。すなわち所定量の実施例1に記載のアルコー  
ル抽出物、実施例2に記載の粗リグナン配糖体濃縮物、  
SDGやSMG、実施例3に記載のSILまたはMHBT、  
実施例5に記載の成分A~Cの各精製物をリノール  
酸(2mg/mL)およびドデシル硫酸ナトリウム(SDGS  
2mg/mL)を含む30mMトリスヒドロキシメチルアミノメ  
タン塩緩衝液(pH7.4)0.92mLで溶解し、2.5mM過  
酸化水素溶液0.04mLおよび2.5mM塩化鉄(II)溶液0.04m  
Lを加え、15時間、37°Cに加温した。なお本発明におい  
て示した活性物質を含む抽出物、濃縮物および精製物を  
含まず同様に反応させたものを対照とした。加温後、  
ブチルヒドロキシルトルエン(BHT)を12mg/mL含む

20 エタノール溶液0.01mLを加えた。TBA12mgおよびSD  
GS16.2mgを蒸留水2.3mLに溶解し、これに20% (v/v)  
酢酸緩衝液(pH4.0)1.5mLおよび前記反応液0.2mL  
を加え、95°Cで1時間加温した。放冷後、532nmにお  
ける吸光度を測定した。対照の吸光度をB、各試料を含  
む反応液の吸光度をAとし、そのヒドロキシラジカル消  
去率を以下の式から算出した。ヒドロキシラジカル消去  
率(%) =  $\{1 - (B - A) / B\} \times 100$ 。表2に示し  
たように、消去率が高い方が消去作用が強いことを示し  
ているが、添加した抽出物および精製物はいずれも顕著  
なヒドロキシラジカル消去作用を示しており、例えば0.  
30 01  $\mu$ mol のSIL 精製物添加により約70%が消去されてい  
た。この効果は $\alpha$ -トコフェロールを大幅に上回ってお  
り、本発明に関わるSDGやSMG、SILまたはMH  
BTを主成分とする抽出物、濃縮物あるいは精製物は、  
強いヒドロキシラジカル消去活性を有することが明らか  
になった。

【0047】

【表2】

表-2

サンプル	ヒドロキシラジカル消去率(%)
アルコール抽出物	60.5
粗リグナン配糖体濃縮物	90.0
成分A	66.0
成分B	67.7
成分C	68.8
SDG 精製物	40.2
SMG 精製物	45.2
SIL 精製物	68.5
MHBT精製物	70.3
$\alpha$ -トコフェロール(0.01 $\mu$ mol)	0.0



(13)

特開平9-208461

23

24

 $\alpha$ -トコフェロール (0.1  $\mu$ mol) 10.5

注) アルコール抽出物または粗リグナン配糖体濃縮物の場合は反応系

中に0.1 mg/mL、各精製物は0.01  $\mu$ M/mL、 $\alpha$ -トコフェロールは0.01  $\mu$ M/mLまたは0.1  $\mu$ M/mL 存在したときの活性量を示す。

## 【0048】実施例8 微粉砕物製剤

アマ種子の搾油粕 (水分 8.0重量%、油分 0.9重量%)  
またはアマ種子の焙煎物の搾油粕 (水分 7.8重量%、油分 2.7重量%) を微粉砕機 (ホンカワミシロン (株) 製、AP-B) を用いて50メッシュの篩を100%通過し、かつ100メッシュの篩を60%通過した微粉末の退色防止剤を調製した。

## 実施例9 (抽出物製剤)

焙煎アマ種子のフレーク状搾油粕 (水分 7.8重量%、油分 2.7重量%) 20gにそれぞれ、30、50、90重量%エタノール 200mLを加え、60℃で5時間抽出した後、ろ過した。この抽出液の溶媒をロータリーエバポレーターで減圧除去し、それぞれ2.4、2.3、0.9gの固形物を得、含水エタノール抽出物からなる退色防止剤を得た。

## 【0049】実施例10 濃縮物製剤

実施例2に記載の方法を繰り返して前記構造式 (II-a) で示されるSDGおよび前記構造式 (II-b) で示されるSMGを含む粗リグナン配糖体濃縮物約8.5gを得、該濃縮物からなる退色防止剤を得た。

## 実施例11 加水分解物製剤

実施例9に記載の方法で得た抽出物製剤 (50%エタノール抽出物) 100gに1Nの塩酸1Lを加え、100℃、1時間加水分解した。これを常温まで戻した後、酢酸エチルを1L加えよく混ぜた。酢酸エチル層を回収し、脱溶剤後、リグナン配糖体 (SMG、SDG等) の糖鎖加水分解物を主成分とする区分を得た。さらにこれにサラダ油を20g添加し、加水分解物を溶解させ、油溶性の加水分解物製剤である退色防止剤を製造した。

## 【0050】実施例12 混合組成物1 (粉体)

実施例9の抽出物製剤 (50%エタノール抽出物) 40%、デキストリン40%、クエン酸20%からなる粉体組成物で

ある退色防止剤を調製した。

## 実施例13 混合組成物2 (液体)

実施例9の抽出物製剤 (50%エタノール抽出物) 30%、グリセリン63%、クエン酸7%からなる液状組成物である退色防止剤を調製した。

## 【0051】実施例14 混合組成物3 (粉体)

実施例9の抽出物製剤 (50%エタノール抽出物) 60%、L-アスコルビン酸ナトリウム40%からなる粉体組成物である退色防止剤を調製した。

## 実施例15 混合組成物4 (油溶性)

実施例9の抽出物製剤 (50%エタノール抽出物) 15g、クエン酸3gを水10gに加温溶解させた後、トコフェロール10g、グリセリン脂肪酸モノエステル30g、サラダ油32gを加え、ホモミキサーで5分間攪拌して親油性退色防止剤100gを得た。

## 【0052】試験例1 マグロに対する退色防止試験

凍結マグロ100gを解凍した後、実施例8及び9に記載の本発明に係る微粉砕物製剤および抽出物製剤 (50重量%エタノール抽出物)、L-アスコルビン酸ナトリウムを各々1.0%含む水溶液 2Lをそれぞれ調製した。また実施例10に記載の粗リグナン配糖体濃縮物を0.1%含む水溶液、実施例11に記載のリグナン配糖体加水分解物を0.1%含む水溶液を各2L調製した。0℃にて前記マグロ肉を各水溶液に1分間浸漬した (各水溶液 2Lでマグロ1kgの処理が可能)。浸漬物の水気をよく拭き取り、未処理物と一緒に5℃で保存した。経時的に、色差計および官能評価にてそれぞれの退色防止効果を比較した。結果を表-3に示す。

## 【0053】

【表3】 表-3 マグロに対する退色防止効果

	色差計 (a 値)		
	0hr	12hr	24hr
未処理物	8.38	7.38	6.34
抽出物製剤	8.51	8.35	8.07
粗リグナン配糖体濃縮物製剤	8.79	8.47	8.20
微粉砕物製剤	8.55	8.30	7.91
リグナン配糖体加水分解物	8.68	8.40	8.21
アスコルビン酸ナトリウム	8.77	7.62	6.45

注) a 値は赤色度の強さを表す。

【0054】色差を測定した結果、上表のとおり本発明品の処理を施した試料 (4種類) が鮮紅色を呈していたのに対し、未処理のものとL-アスコルビン酸ナトリウムを添加した試料は暗褐色に変色していた。また、20名のパネラーによる官能評価の結果、本発明品で処理した

マグロは風味、味ともに何ら問題が認められなかった。以上の結果より、本発明品の退色防止効果の有効性が確認された。

## 試験例2 ニンジンに対する退色防止試験

生ニンジンを0.5~3.0mmの厚さに輪切りにし、実施例

(14)

特開平9-208461

25

9. 12、13及び14に記載の本発明に係る退色防止剤である抽出製剤および混合組成物をそれぞれ0.5%含む各水溶液中、また実施例11で得たリグナン配糖体加水分解物を0.05%含む水溶液中で5分間ブランチング処理した。コントロールは水を用いて同様の処理を行った。次に、これらの水をよく切って凍結乾燥した。完全

26

に乾燥した後、蛍光照射下(5000 Lux)、25℃で保存した。保存を開始してから10日後、退色の様子を調べた。結果を表-4および表-5に示す。

【0055】

【表4】

表-4 ニンジンに対する退色防止効果

果

試験区	ニンジン表面の色
コントロール	退色が激しく、白化著しい。
抽出物製剤	部分的に白っぽくなっているが、よく色調を保持。
リグナン配糖体加水分解物	部分的に白っぽくなっているが、よく色調を保持。
混合組成物1	部分的に白っぽくなっているが、よく色調を保持。
混合組成物2	部分的に白っぽくなっているが、よく色調を保持。
混合組成物3	発色が良く、鮮やかなオレンジを維持。

【0056】

【表5】

表-5 ニンジンに対する退色防止効果

試験区	色差計(a値)	
	0日	10日
コントロール	25.81	2.41
抽出製剤	25.18	17.33
リグナン配糖体の加水分解物	25.43	17.78
混合組成物1	25.55	16.77
混合組成物2	25.31	13.51
混合組成物3	25.22	21.18

【0057】以上のように本発明品に係る抽出物製剤および混合組成物では、ニンジンに対する退色防止作用があることが明らかになった。また前記の抽出物製剤、混合組成物1、同2および同3はいずれの場合にもL-アスコルビン酸ナトリウムとの相乗効果が認められた。

試験例3 オレンジジュースに対する退色防止試験  
温州ミカンの果肉を採り、ジューサーにかけてからろ紙でろ過し果汁を回収した。このジュースに実施例9に記載の本発明に係る抽出物製剤を0.5%含むように添加した。また前記ジュースに実施例10に記載の本発明に係る粗リグナン配糖体濃縮物製剤を0.05%含むように添加した。これらの試料と前記製剤無添加のジュースとを10℃、5000 Luxの蛍光灯照射下で3日間保存試験をした。その結果、無添加のジュースが退色したのに対し、本発明品を添加したジュースは好ましいオレンジの色調を保持していた。

【0058】試験例4 牛肉に対する退色防止試験  
凍結牛肉をスライスした後冷蔵庫で解凍した。実施例8及び9に記載の本発明に係る微粉碎物製剤および抽出物製剤(50%エタノール抽出物)のいずれか2.5%を含む0℃水溶液をそれぞれ調製し、それらをスライスした牛

肉100g当たり5mLずつ噴霧した。水気をよく拭き取り、5℃で5日間保存した。その結果、無添加の牛肉が暗褐色に変色したのに対し、本発明品を添加したものは好ましい肉色を保持していた。

試験例5 ネギトロ用ミンチ状生鮮まぐろ肉に対する退色防止試験

凍結されたマグロのさくを解凍しフードカッターで破砕した後、このマグロ肉に対して8%のサラダ油を加えて十分に混和し、ネギトロ用ミンチ状生鮮まぐろ肉(以下、単にネギトロという)を作製した。ネギトロ100gに対して、実施例11及び15に記載の本発明に係る加水分解物製剤および混合組成物4あるいはL-アスコルビン酸ナトリウムのいずれか0.1gを添加した試料と退色防止剤無添加の試料の3種のネギトロを用意し、8℃、3日間保存試験を行った。経時的に色差を測定して退色の様子を調べるとともに官能評価を行った。結果を表-6に示す。

【0059】

【表6】

表-6 ネギトロに対する退色防止効果

効果

試験区	色差計(a値)		
	0日	1日	3日

(15)

特開平9-208461

27

28

未処理物	10.01	7.61	4.76
加水分解物製剤	9.97	9.28	7.99
混合組成物4	9.88	9.30	8.11
アスコルビン酸ナトリウム	10.11	8.86	4.18

【0060】以上の結果から本発明品を含有するネギトロは色調がよく保持され、本発明品の退色防止効果がよく発揮されていた。また、試験例1に記載の方法で官能評価を行った結果、本発明品を添加したネギトロは何ら

風味、味に、問題が認められなかった。以上の結果より、本発明品であるアマ種子抽出物の退色防止効果の有効性が確認された。

フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	FI	技術表示箇所
A 2 3 L 3/3562			A 6 1 K 31/085	
A 6 1 K 31/085			31/34	
31/34			31/70	A E D
31/70	A E D		35/78	C
35/78			C 0 7 D 307/12	
// A 2 3 B 4/00			C 0 7 H 15/18	
C 0 7 D 307/12			A 2 3 L 2/16	
C 0 7 H 15/18			A 2 3 B 4/00	E

(72)発明者 三浦 慎一郎  
神奈川県横浜市中区中丸1-101

(72)発明者 無類井 建夫  
東京都大田区西蒲田5-13-7

0008359994

WP1 Acc no: 1997-474213/199744

Active oxygen species remover comprising lignan compound - used as active ingredient of fading prevention agent

Patent Assignee: NISSHIN OIL MILLS LTD (NISW)

Inventor: FUNABASHI A; KURIYAMA K; MATSUGUCHI H; MIURA S; MURUI T; TSUJI H

Patent Family ( 2 patents, 1 countries )							
Patent Number	Kind	Date	Application Number	Kind	Date	Update	Type
JP 9208461	A	19970812	JP 199614601	A	19960130	199744	B
JP 3065925	B2	20000717	JP 199614601	A	19960130	200039	E

Priority Applications (no., kind, date): JP 199614601 A 19960130

Patent Details						
Patent Number	Kind	Lang	Pgs	Draw	Filing Notes	
JP 9208461	A	JA	15	0		
JP 3065925	B2	JA	15		Previously issued patent	JP 09208461

## Alerting Abstract JP A

An active oxygen species remover comprises a lignan compound of formula (I) as an active ingredient. R1-R4 = H or 1-3C alkyl; R5,R6 = OH or sugar chain residue in which 1-3 sugars selected from glucose, galactose and fructose are linked by glycoside bonds; or R5+R6 = O.

USE - (I) are used as active ingredients of fading prevention agents (claimed).

ADVANTAGE - The active oxygen species remover effectively and simultaneously removes superoxide and the hydroxy radical. The fading prevention agent has a potent effect with no taste and smell so that it does not affect the taste of foods to which the agent is added.



Japanese Patent Laid-Open No. 9-208461

[0007]

Recently, attention has been drawn to the physiological actions of a lignan compound having two phenol groups, which is a characteristic substance of flaxseeds. The lignan compound used herein is generally defined as a low molecular weight compound of the oxidative condensation substances of p-hydroxybenzene propane units. Flaxseeds are rich in lignans including Secoisolariciresinol diglycoside (hereinafter, sometimes simply referred to as "SDG"), which is composed of Secoisolariciresinol (2,3-bis(3-methoxy-4-hydroxybenzyl)butane-1,4-diol (hereinafter sometimes simply referred to as "SIL") serving as an aglycone and sugars such as glucose bonded to Secoisolariciresinol, and Secoisolariciresinol mono-glycoside (hereinafter sometimes simply referred to as "SMG"), which is composed of Secoisolariciresinol and a single sugar bonded to the Secoisolariciresinol. When the chemical structures of SDG and SMG are converted by the actions of bacteria such as enteric bacteria present in living animals such as mammals, which eat flaxseeds or defatted cake thereof, they turn into physiologically active Enterodiol and Enterolactone. It has been elucidated that these substances have strong anticancer activities against breast cancer and colon cancer and flaxseeds contain SDG and SMG in extremely large amounts compared to other edible plants. It has been thus reported that flaxseeds are effectively used as a precursor of a physiologically active

lignan (for example, "Flaxseed in Human Nutrition", written by S. C. Cunnane and L. U. Thompson, p. 219-236, AOAC press, 1995).

[0008]

As is described above, SDG and SMG contained in large amounts in flaxseeds have been studied up to present mainly on usefulness as precursors of Enterodiol and Enterolactone. However, little has been known about physiological activities (except the aforementioned ones) of SDG, SMG, a sugar chain hydrolysates thereof, SIL, or a dehydrated product thereof: 3,4-bis(3-methoxy-4-hydroxybenzyl)tetrahydrofuran (hereinafter sometimes simply referred to as "MHBT") and their applications, up to present.

[0019]

In the formulas, Glc represents a glucose residue, Gal represents a galactose residue.

Lignan compounds SDG and SMG, the sugar-chain hydrolysate SIL or the dehydrated product MHBT to be used in the present invention can be chemically synthesized. However, they can be easily prepared by the following extraction method using, for example, flaxseeds as a raw material. To describe the method more specifically, flaxseeds are first crushed into pieces by a crusher such as a mixer, blender, or homogenizer. Any flaxseeds may be used as a raw material herein, regardless of a production district such as Japan or Canada, merchandise category such as breeding or oil extraction, and roasted product or not. Alternatively, compressed product and oil cake of flaxseeds produced during an oil extraction process may be used as the raw material. Oil may be completely removed from the crushed pieces obtained by extracting with a lipid-soluble organic solvent such as n-hexane to obtain a defatted product. Next, lower alcohol or a water-containing lower alcohol capable of extracting SDG and SMG is added to the crushed pieces or defatted cake thereof in a 1 to 10 fold volume (v/wt; v: volume, wt: weight, hereinafter the same definitions will be used) of them. The crushing and extraction operations are repeatedly performed as needed and solid matter is removed by the customary methods including decantation, centrifugation and filtration, and thereafter, moisture and alcohol contents are removed with heating or without heating under normal pressure or reduced pressure to

obtain an alcohol extract. The alcohol extract is a mixture containing SDG and SMG according to the present invention.

[0020]

As the lower alcohol or water-containing lower alcohol used herein, an alcohol solution having an alcohol concentration of 30 to 100% (v/v), preferably 40 to 100% (v/v), more preferably, 40 to 90% (v/v), and most preferably 50 to 80% (v/v) may be suitably used, which is prepared by adding water to linear or branched lower alcohol having 1 to 4 carbon atoms such as methanol, ethanol, n-propanol, isopropanol or n-butanol, as needed. When the alcohol content is less than 30% (v/v), a viscous substance intrinsic to flaxseeds may elute out, rendering the following operation difficult.

[0021]

Note that, to remove lipid soluble impurities except a lignan compound according to the present invention from the alcohol extract, an extraction process with a solvent may be performed as follows. To describe it more specifically, extraction is performed by adding a 2 to 10 fold volume (v/wt) of a water-insoluble organic solvent such as chloroform or n-hexane and water to the alcohol extract. The mixture is separated into two phases by centrifugation or in other ways. The organic solvent phase is removed and the aqueous phase is concentrated and dried to obtain solid matter. At this time, desired lignan compounds such as SDG and SMG are concentrated in the aqueous phase. The aqueous phase can be concentrated and dried under reduced pressure to obtain an extraction fraction (crude lignan glycoside concentrate) rich in SDG and SMG



according to the present invention. The crude lignan glycoside concentrate is a mixture of components represented by the aforementioned structural formula (I) and main components thereof are SDG and SMG represented by the structural formulas (II-a) and (II-b), respectively.

[0022]

Note that, the alcohol extract and crude lignan glycoside concentrate mentioned above can be purified, if necessary, by fractionating it by use of an adsorbent such as silica gel or octadecyl silica (ODS). To describe it more specifically, a column charged with ODS is prepared and equilibrated with water. Thereafter, the alcohol extract or crude lignan glycoside concentrate is fed to the column in a loading ratio of 0.1 to 5% (wt/v). Using a water-containing alcohol solvent (containing an alcohol such as methanol, ethanol, n-propanol, isopropanol or n-butanol), predetermined fractions are eluted by a stepwise elution method while increasing alcohol concentration stepwise or by a continuous elution method. Note that, the fractions eluted may be subjected, if necessary, to chromatographic purification such as high performance liquid chromatography (HPLC) or preparative liquid chromatography using the aforementioned adsorbent to purify each component to a further higher purity. In this way, water-soluble lignan compounds such as SDG and SMG can be obtained in the present invention. As the lignan compound, either one of the alcohol extract and crude lignan glycoside concentrate mentioned above, or the highly purified product may be used singly or in mixture.

[0023]

Next, a method of preparing SIL and MHBT from the alcohol extract or crude lignan glycoside concentrate obtained from flaxseeds will be described. Since SDG and SMG are rich in the alcohol extract or crude lignan glycoside concentrate, they are hydrolyzed with an enzyme or an acidic substance to easily obtain SIL or MHBT represented by the aforementioned structural formulas (II-c) and (II-d). Note that MHBT used herein is a dehydrated product secondarily produced from SIL by an acid hydrolysis reaction but is not obtained by an enzymatic hydrolysis reaction. The alcohol extract or crude lignan glycoside concentrate is dispersed in water or an appropriate buffer solution. To the mixture, as a sugar chain hydrolysis enzyme, single or a plurality of types of glucosidases such as  $\beta$ -glucosidase, cellulase,  $\alpha$ -glucosidase,  $\beta$ -galactosidase,  $\alpha$ -galactosidase, amylase and glucuronidase is added. Alternatively, the mixture is subjected to a vessel (used continuously or repeatedly) having these enzymes immobilized onto an appropriate carrier such as activated carbon or cerite, allowed to be in contact with the enzymes at 10 to 60°C for 1 to 48 hours to enzymatically cleave the sugar chains of SDG and SMG. Alternatively, the alcohol extract or crude lignan glycoside concentrate is heated at 50 to 200°C for 30 minutes to 5 hours in the presence of an acid such as hydrochloric acid, sulfuric acid, phosphoric acid or an organic acid. Since SIL or MHBT produced from SDG and SMG is a lipid soluble lignan compound, it can be efficiently extracted from an enzymatic or acid hydrolytic reaction solution with an organic solvent having a low polarity

and less soluble in water, such as n-hexane, chloroform or ethyl acetate. The organic solvent phase containing an extract is concentrated to obtain a crude lignan concentrate.

[0024]

Note that, if necessary, SIL or MHBT can be purified by fractionating it by an adsorbent such as silica gel or octadecyl silica (ODS). More specifically, each component can be purified to a further higher purity by subjecting it to chromatography such as high performance chromatography (HPLC) or preparatory liquid chromatography. In the present invention, the lipid soluble crude lignan concentrate, SIL or MHBT thus obtained can be used as it is or in mixture.

## [Examples]

### Example 1

After flaxseeds (1000 g) produced in Canada was crushed by a blender, 3-fold (v/wt) n-hexane was added. Extraction was performed under reflux at 60°C for 3 hours. After filtration, defatted cake was obtained. Of the defatted cake, 50 g of the cake was dried in air. To this, 3-fold (v/wt) water-containing methanol of an alcohol concentration: 80 wt% (hereinafter simply referred to as "%") was added. Extraction was performed under reflux at 60°C for 5 hours. After cooling, the whole amount of the extract was filtrated. The filtrate was concentrated by dehydration to obtain 70 g of a methanol extract in a solid state.

[0034]

### Example 2

The methanol extract (30 g) obtained in Example 1 was subjected repeatedly to preparatory chromatography using ODS as a carrier. More specifically, a glass column (3 cm in diameter and 50 cm in length) was charged with 60 g of YMC-GEL (ODS-A) manufactured by YMC Co., Ltd. and equilibrated with water. To the column, the methanol extract was loaded through the top. Elution was started by supplying water and then increasing the concentration of methanol stepwise to obtain a desired substance. The fractions eluted by 30 to 70%(v/v) methanol solvent containing water were collected and concentrated under reduced pressure to obtain about 4.5 g of crude lignan glycoside concentrate. This concentrate was repeatedly subjected to preparatory HPLC until SDG and SMG were obtained as single



purified products. As a result, 350 mg of purified SDG product represented by the aforementioned structural formula (II-a) and 30 mg of purified SMG product represented by the structural formula (II-b) were obtained. The preparatory HPLC was performed under the following conditions. The HPLC apparatus was prepared by connecting, to a pump (CCPM, manufactured by Tosoh Corporation), a column (Soken Pak, (manufactured by Soken Kagaku), ODS-W5 $\mu$ , 10  $\times$  250 mm), and a UV absorption detector (UV-8000, manufactured by Tosoh Corporation). Elution conditions were a linear gradient (a ratio of water to methanol of 50:50 changes to 10:90 in 40 minutes), a flow rate of 5 mL/min and a detection wavelength of 280 nm. Note that the types of sugars and the number of sugar compounds were analyzed as follows (hereinafter, the same operation was performed).

[0046]

#### Example 7

A hydroxy radical scavenging activity was measured as follows. In the reaction system used in this Example, hydroxy radicals were generated in a fenton reaction and allowed to react with a fatty acid to produce malondialdehyde (MDA). The malondialdehyde (MDA) was then allowed to react with thiobarbituric acid to produce thiobarbituric acid-MDA adduct. Hydroxy radical scavenging activity was determined based on measurement of the thiobarbituric acid-MDA adduct. To describe more specifically, a predetermined amount of the alcohol extract (described in Example 1), crude lignan glycoside concentrate, SDG or SMG (described in Example 2), SIL or MHBT (described in Example 3), or each purified product of the components A to C (described in Example 5) was dissolved in 0.92 mL of 30 mM tris-hydroxymethylaminomethane hydrochloride buffer (pH 7.4) containing linoleic acid (2 mg/mL) and sodium dodecylsulfate (SDCS) (2 mg/mL). To this mixture, 0.04 mL of a 2.5 mM aqueous hydrogen peroxide solution and 0.04 mL of a 2.5 mM iron chloride (II) solution were added. The mixture was heated at 37°C for 15 hours. Note that a sample containing none of an extract, concentrate and purified product containing the active ingredients shown in the present invention was allowed to react in the same manner as mentioned above, as a control. After the heating, 0.01 mL of an ethanol solution containing 12 mg/mL t-butylhydroxytoluene (BHT) was added. TBA (12 mg) and SDGS (16.2 mg) were dissolved in 2.3 mL of distilled water. To this, 1.5 mL of 20% (v/v) acetate buffer (pH 4.0) and 0.2 mL of the

aforementioned reaction solution were added and the reaction solution was heated at 95°C for one hour. After cooling, the absorbency of the reaction solution was measured at 532 nm. Assuming that the absorbency of the control was represented by B and the absorbency of the reaction solution containing each sample was represented by A, the scavenging rate of hydroxy radicals was calculated in accordance with the following equation. Hydroxy radical scavenging ratio (%) =  $\{1 - (B - A)/B\} \times 100$ . As shown in Table 2, the higher the scavenging ratio, the stronger the scavenging action. Any one of the extracts and purified products added herein exhibited a remarkable hydroxy radical scavenging action. For example, when 0.01  $\mu\text{mol}$  SIL purified product was added, about 70% of hydroxy radicals was scavenged. The effect greatly exceeded that of  $\alpha$ -tocopherol. It was therefore demonstrated that an extract, concentrate or purified product containing SDG, SMG, SIL or MHBT according to the present invention as a main component, has a strong hydroxy radical scavenging activity.

[0047]

[Table 2]

Table-2

Sample	Hydroxy radical scavenging rate (%)
Alcohol extract	60.5
Crude lignan glycoside concentrate	90.0
Component A	66.0
Component B	67.7
Component C	68.8
SDG purified product	40.2
SMG purified product	45.2
SIL purified product	68.5
MHBT purified product	70.3
$\alpha$ -tocopherol (0.01 $\mu$ mol)	0.0
$\alpha$ -tocopherol (0.1 $\mu$ mol)	10.5

Note) The content of an active ingredient in the reaction system of the alcohol extract and crude lignan concentrate is 0.1 mg/mL; 0.01  $\mu$ M/mL in each purified product; and 0.01  $\mu$ M/mL or 0.1  $\mu$ M/mL in  $\alpha$ -tocopherol.



#### Example 9 Extract preparation

To 20 g of oil cake flakes of roasted flaxseeds (moisture content 7.8 wt%, oil content: 2.7 wt%), 200 mL of 30, 50, and 90 wt% ethanol solutions were individually added. Extraction was performed at 60°C for 5 hours and then filtration was performed. The solvent of the extraction solution was removed by a rotary evaporator under reduced pressure to obtain 2.4, 2.3 and 0.9 g of solid matters, respectively. In this manner, color fading inhibitors formed of a water-containing ethanol extract were obtained.

[0049]

#### Example 10 Concentrate preparation

The method described in Example 2 was repeated to obtain about 8.5 g of crude lignan glycoside concentrate containing SDG represented by the structural formula (II-a) and SMG represented by the structural formula (II-b) and then obtain a color fading inhibitor containing the concentrate.

#### Example 11 Hydrolysate preparation

To 100 g of the extract preparation (50% ethanol extract) obtained by the method described in Example 9, 1L of 1N hydrochloric acid was added. Hydrolysis was performed at 100°C for one hour. After the reaction solution was returned to normal temperature, 1L of ethyl acetate was added and stirred well. The ethyl acetate layer was recovered and the solvent was removed therefrom to obtain a fraction primarily containing the sugar chain hydrolysates of lignan glycosides (such as SMG, SDG). To the fraction, 20 g of salad oil was added to dissolve the

hydrolysates. In this manner, a color fading inhibitor, which is a lipid-soluble hydrolysate, was produced.